

Universidad Autónoma de Madrid  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular

AVANCES EN EL ESTUDIO DEL  
DESARROLLO DE LA EXTREMIDAD EN  
VERTEBRADOS:  
PAPEL DE ARID3B EN LA MORFOGÉNESIS  
DEL AER Y ANÁLISIS DE LA FORMACIÓN  
DE LA PUNTA DE LOS DEDOS

TESIS DOCTORAL

Jesús Chamorro Casanova

Madrid 2009

El trabajo experimental presentado en esta memoria ha sido realizado en el Departamento de Inmunología y Oncología del Centro nacional de Biotecnología y en el Departamento de Biología del Desarrollo Cardiovascular en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares bajo la dirección del Dr. Juan José Sanz Ezquerro.

El doctorando disfrutó, durante parte de este trabajo de una beca FPU del Ministerio de Educación y Ciencia.

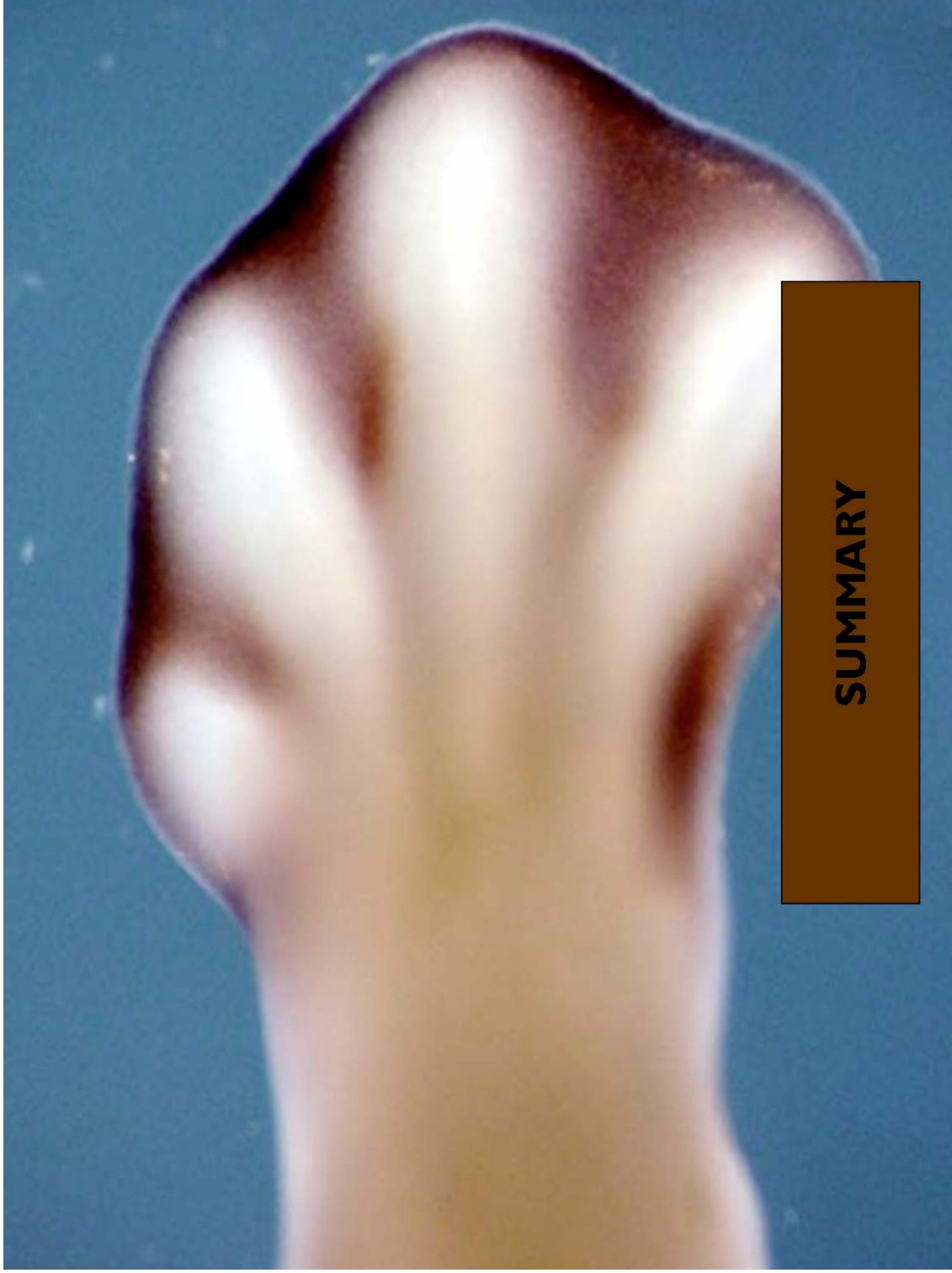


# **ÍNDICE**

<b>Summary</b>	<b>I</b>
<b>Introducción</b>	<b>5</b>
1. La biología del desarrollo	7
2. El desarrollo de la extremidad de vertebrado	10
2.1. La extremidad de vertebrado	10
2.2. Posicionamiento e identidad de las extremidades	11
2.3. Inducción del primordio de la extremidad	12
2.4. La cresta ectodérmica apical o AER y el crecimiento próximo-distal de la extremidad	15
2.5. La zona de actividad polarizante y el eje antero-posterior	36
2.6. Interacción entre los diferentes centros de señalización	40
2.7. La formación de los dedos: dígitos e interdígitos	42
2.8. Crecimiento de dígitos: falanges y articulaciones	44
2.9. Plasticidad en la identidad de los dedos	45
2.10. La punta: una falange diferente	48
2.11. Diferenciación de las condensaciones: Osificación endocondral	51
3. Estudio de nuevos genes en la extremidad de vertebrado	53
3.1. El proyecto de genómica comparada: Abordaje de genes candidatos	53
3.2. Estudios en la formación de la punta de los dedos	58
<b>Objetivos</b>	<b>61</b>
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>65</b>

<b>Resultados</b>	<b>97</b>
1. Proyecto de Genómica: Arid3b en la extremidad de vertebrado	99
1.1. <i>Screening</i> de expresión en el embrión de ratón: de la mosca a vertebrados	99
1.2. Análisis del patrón de expresión del gen Arid3b en el embrión de ratón y pollo	99
1.3. Clonaje del gen Arid3b de pollo	113
1.4. Análisis funcional del gen Arid3b en el embrión de ratón y pollo	116
1.5. Análisis funcional del gen Arid3b en el embrión de ratón y pollo: mecanismo	133
2. Desarrollo de los dedos y formación de la última falange	160
2.1. Estudio del patrón de osificación de las falanges en la extremidad inferior del embrión de pollo	160
2.2. Estudio del patrón de osificación de las falanges en la extremidad superior del embrión de pollo	163
2.3. Caracterización del patrón de expresión de Sp8 en las extremidades del embrión de pollo y ratón	164
2.4. Caracterización del patrón de expresión de Bambi en las extremidades del embrión de pollo	168
2.5. Estudio del patrón de osificación de las falanges en la extremidad inferior del embrión de pato	170
2.6. Estudio del patrón de osificación de las falanges en la extremidad superior del embrión de pato.	171
2.7. Caracterización del patrón de expresión de Bambi en las extremidades del embrión de pato.	173
2.8. Caracterización del patrón de expresión de Bambi en extremidades superiores de pollo en las que se inducen transformaciones en la identidad de los dedos	174

<b>Material Suplementario</b>	<b>177</b>
<b>Discusión</b>	<b>185</b>
1. El proyecto de genómica	187
2. Expresión de Arid3b en el embrión de vertebrado	187
3. Expresión de Arid3b en el primordio de la extremidad de vertebrado	189
4. Clonaje del homólogo de Arid3b en el embrión de pollo	190
5. Ensayos de ganancia de función en el embrión de pollo	190
6. Ensayos de pérdida de función en el embrión de pollo	191
7. Ensayos de pérdida de función en el embrión de ratón	192
8. Arid3b en la formación de la extremidad de vertebrado	194
9. Osificación en las extremidades del embrión de pollo y pato	201
10. La punta de los dedos en pollo y pato osifica de manera diferente al resto de las falanges	202
11. Bambi y Sp8 son marcadores de punta conservados en diferentes especies	203
12. El dedo 3 del ala del pollo es un dedo truncado que carece de punta	204
13. Aportación al origen monofilético del orden Galliformes y Anseriformes	205
14. Experimentos de manipulación en primordios tardíos provocan cambios en la identidad molecular de los dedos	205
<b>Conclusiones</b>	<b>207</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>211</b>





# **SUMMARY**

Vertebrate limb development has been considered an excellent model by which to analyze many different aspects of embryonic morphogenesis. The understanding of cellular events such as apoptosis, proliferation and differentiation, as well as the acquisition of a complex organisation inside the diverse organs, can be facilitated using this model. The vertebrate appendage can first be detected as a limb bud, consisting of an undifferentiated group of mesenchymal cells covered with an ectodermal jacket. Inside this structure, some specialized signalling centers that guide fine development of the limb are established. One of these signalling centers, the Apical Ectodermal Ridge (AER), is a thickened, specialized epithelium located at the dorso-ventral border along the antero-posterior margin of the limb bud. The AER is involved in proximo-distal limb outgrowth and its removal leads to limb truncation at different levels. The particular structure of the AER is one of its most interesting features. It is a pseudostratified epithelium in chicken and a polistratified epithelium in mouse. Although there are several data about AER induction or localization, little is known about how a single cuboidal epithelium is able to attain this complex organization.

In order to understand the molecular events associated with vertebrate limb formation we have carried out an approach based on a screening of *Drosophila* mutations that cause wing defect phenotypes. One of the candidate genes is a member of the ARID family of transcription factors called *Arid3b/Dril2/Bdp*, one of the vertebrate homologues of *Drosophila* Dead ringer/Retained. We have analyzed *Arid3b* expression patterns in mouse and chicken embryos at different stages and found that it is expressed in the apical ectodermal ridge during limb formation, as well as in other important structures. With the purpose of carrying out gain of function assays in chicken embryos we cloned chicken *Arid3b* cDNA and optimised the technique of electroporation in the ectoderm of the prospective limb. Overexpression of WT *Arid3b* leads to a disorganized AER. Further, electroporation of a dominant negative form, as well as knockdown approach with morpholinos, confirmed an important role of this molecule in AER maturation/structuring and, by extension, in chicken limb outgrowth.

Subsequently, a mouse Knock-out model has been generated and the genetic deletion of *Arid3b* caused embryonic lethality around E10.5 with a severe phenotype including cardiovascular defects. The absence of this factor during mouse limb development affects AER organization, supporting the data obtained in loss of function assays in chicken.

With the aim of finding out the possible molecular mechanism responsible for this phenotype, we studied different signalling pathways implicated in AER formation in our mouse mutant and in electroporated chicken embryos. Moreover we performed apoptosis/proliferation assays on these specimens. None of the results obtained can apparently explain the alterations described. On the other hand, examination of cellular morphology showed that the affected AERs are unable to attain a proper structuring suggesting an important role of *Arid3b* in this process and pointing to a possible defect in cellular architecture, migration or adhesion.

Tip formation is the last step in the skeletal patterning of developing digits. This process has not been studied in detail compared to other events involved in digit morphogenesis but several lines of evidence indicate that tips are special.

Apart from evident morphological differences, the last phalange of digits has some distinctive characteristics. The most obvious feature is the presence of specialized ectodermal structures such as nails or claws, appendages that confer anatomical and histological variations with respect to other phalanges, including a special microvascular system. A different ossification pattern reported in mammals is another histological difference that makes tips exclusive. The expression of some genes specifically in the distal phalange during digit morphogenesis suggests a particular genetic program implicated in tip formation. This program may be correlated with the special features mentioned above and with the regeneration ability of the last phalange in mammals. In this thesis, we present data that contribute to our understanding of what makes the tip unique. A detailed description of the ossification patterns of phalanges in chick and duck embryos revealed different dynamics between the tip and proximal/medial phalanges. Moreover we found that the genes *Sp8* and *Bambi* are expressed specifically in the last phalanges of mouse and chick embryos during tip formation. *Bambi* is also expressed in other species such as the duck. All these data demonstrate a highly conserved special molecular program through tip development. Our results could shed light on the questions of digit identity and homology during development and evolution.



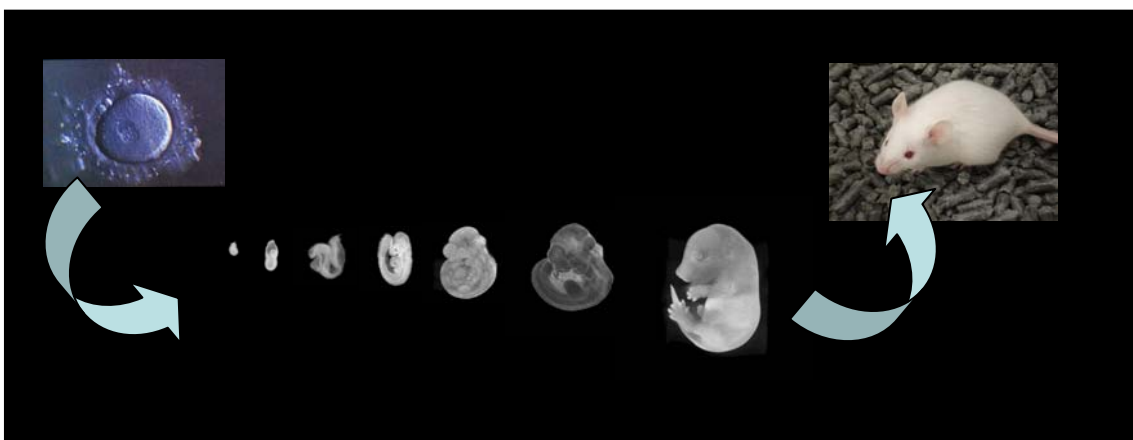




# INTRODUCCIÓN

## I. La biología del desarrollo

La biología del desarrollo es la ciencia encargada de estudiar los mecanismos por los cuales el cigoto, una única célula fruto de la unión de un óvulo y un espermatozoide, es capaz de generar un organismo adulto complejo, formado por un elevado número de células, tejidos y órganos (Fig. 1)



**Figura 1:** Desarrollo embrionario en el ratón (*Mus musculus*). Los procesos que permiten la formación de un individuo adulto a partir del cigoto son sujeto de estudio de la biología del desarrollo

Durante este proceso las células que componen el organismo en formación están sometidas a un minucioso control espacio-temporal de la expresión génica que permite la adquisición de niveles más altos de complejidad. Esta complejidad no viene marcada únicamente por un incremento en el número de células, sino en cómo éstas adquieren un nivel de diferenciación y especificación de acuerdo a un patrón determinado, proporcionando la funcionalidad necesaria al órgano que constituyen.

Aunque la biología del desarrollo trata de esclarecer los acontecimientos responsables de la formación del embrión, además engloba numerosos fenómenos que se producen tanto en la etapa juvenil como en el organismo adulto. Así pues numerosos eventos como la homeostasis tisular o la regeneración, son estudiados por esta disciplina.

Desde hace varias décadas el desarrollo de la extremidad en vertebrados es uno de los sistemas modelos más utilizados en este campo, no sólo porque nos permite el análisis de los procesos básicos de la biología celular como proliferación, diferenciación y apoptosis sino por sus implicaciones para comprender la etiología de enfermedades congénitas humanas o los mecanismos de variación y diversificación morfológica durante la evolución. Una importante ventaja de este modelo es que las extremidades

no son necesarias para el desarrollo del embrión lo que permite su manipulación sin interferir con la viabilidad de éste. Por otra parte, sabemos que las vías de señalización implicadas en el desarrollo de la extremidad de vertebrados son similares en otros contextos embrionarios y, por tanto, los conocimientos obtenidos con este modelo son, en muchas ocasiones, extrapolables (Fig. 2).

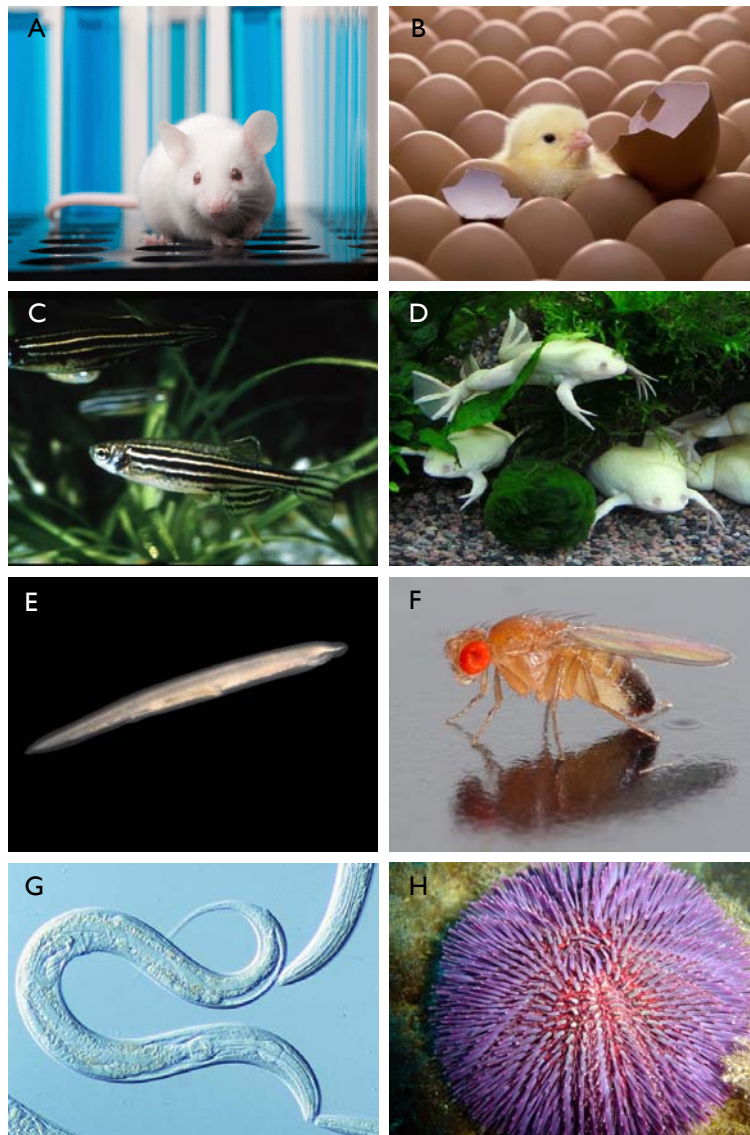


**Figura 2:** El estudio de la extremidad de vertebrado presenta numerosas ventajas: (A) Son estructuras no esenciales para la viabilidad del embrión; (B) Existen enfermedades congénitas humanas que afectan a la extremidad (C) Permite el análisis de procesos básicos celulares (muerte, proliferación, diferenciación...); (D) Las vías de señalización aparecen conservadas en el desarrollo de otras estructuras; (E) Es una buena herramienta para el estudio de la diversificación morfológica durante la evolución.

En el estudio de la biología del desarrollo se emplean numerosos organismos modelo, cada uno con sus ventajas e inconvenientes (Fig. 3). Los dos modelos utilizados en esta tesis doctoral han sido:

El embrión de pollo, es fácilmente accesible y puede manipularse en el interior del huevo. Esto, unido a su resistencia y plasticidad permite experimentos de ablación, transplantes o colocación de microesferas impregnadas en factores de crecimiento o inhibidores. Por otro lado, mediante la utilización de vectores virales o mediante la electroporación de plásmidos se pueden realizar experimentos localizados de sobreexpresión o silenciamiento de genes.

El embrión de ratón, presenta dos claras ventajas respecto al resto de organismos modelo. La primera es que filogenéticamente se encuentra más cerca del ser humano, de manera que los hallazgos realizados son más directamente extrapolables al ámbito clínico. La segunda es la posibilidad de utilizar la genética como abordaje experimental. La capacidad de sobreexpresar o inactivar genes *in vivo*, en el espécimen entero o de forma tejido específica, incluso de manera controlable por fármacos hacen del ratón un organismo modelo único.



**Figura 3:** Organismos modelos más frecuentemente utilizados en biología del desarrollo: (De arriba abajo y de izquierda a derecha) Ratón (*Mus musculus*), pollo (*Gallus gallus*), pez cebra (*Danio rerio*), sapo africano (*Xenopus laevis*), anfibio (*Brachyostoma lanceolatum*), mosca (*Drosophila melanogaster*), gusano nematodo (*Caenorhabditis elegans*) y erizo de mar.

## **2. El desarrollo de la extremidad de vertebrado**

### **2.1 La extremidad de vertebrado**

La extremidad se define como un apéndice, generalmente articulado, que ciertos animales utilizan como medio de locomoción.

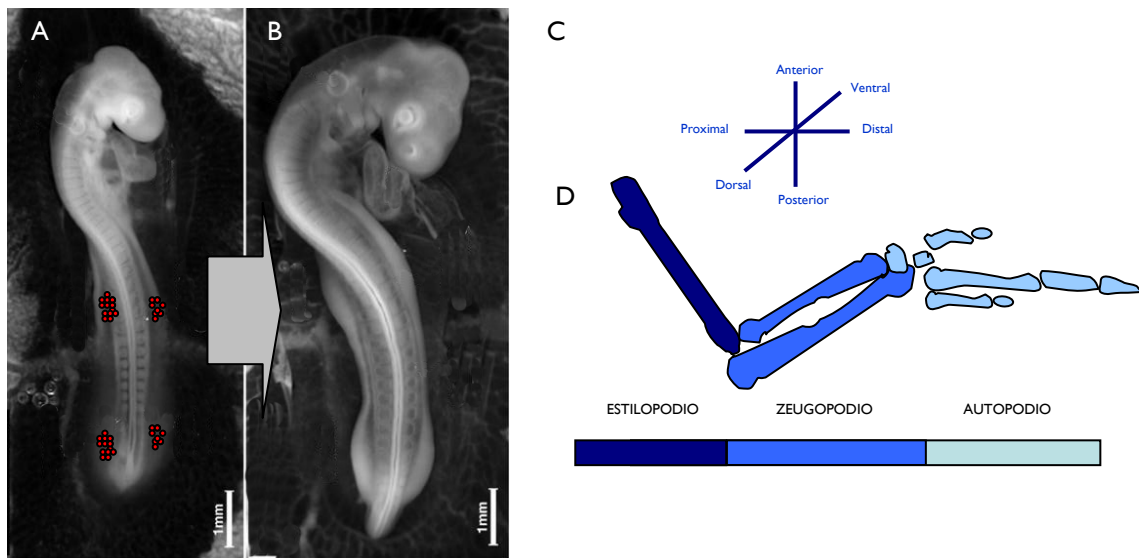
Aunque anteriormente se ha indicado que este órgano no resulta imprescindible para la vida del embrión, la importancia de las extremidades resulta evidente. Desplazamiento sobre diferentes medios, manipulación, así como interacción con otros organismos, son algunos ejemplos de los numerosos papeles que ejercen las extremidades en los animales. Debido a su diversa funcionalidad, este apéndice ha sufrido numerosas variaciones adaptativas a lo largo de la evolución, permitiendo una mejor aclimatación de los organismos a su entorno.

Los primeros indicios de las extremidades son visibles a estadios tempranos, como unos pequeños abultamientos en posiciones específicas del eje primario del embrión. En un momento determinado del desarrollo embrionario, los niveles proliferativos a lo largo del flanco del embrión disminuyen, permitiendo que un grupo de células mesenquimales indiferenciadas y localizadas en regiones predeterminadas del mesodermo lateral, proliferen de manera diferencial (Searls and Janners, 1971) (Fig. 4). Estas células mesenquimales indiferenciadas, con una superior tasa proliferativa respecto al flanco y recubiertas de una capa de ectodermo, van a dar lugar al primordio de la extremidad. Entre el ectodermo y el mesénquima de este primordio se van a instaurar una serie de interacciones específicas que van a permitir la constitución de un conjunto de centros de señalización imprescindibles para el correcto desarrollo de esta estructura. El papel de dichos centros de señalización consiste en promover el crecimiento de la extremidad así como el establecimiento de un patrón a lo largo de los tres ejes (Capdevila and Izpisua Belmonte, 2001; Niswander, 2003; Tickle, 2003) (Fig. 4).

A medida que el primordio se desarrolla, los diferentes elementos que formarán el esqueleto de la extremidad se van constituyendo, siguiendo una secuencia próximo-distal. El elemento localizado en la región más proximal es el llamado estilopodio y está constituido por un único componente, el húmero en la extremidad superior y el fémur en la extremidad inferior. El siguiente elemento se conoce como zeugopodio y está formado por el radio y la ulna en la extremidad superior o por la tibia y la fibula en la inferior. Al autopodio, elemento más distal, pertenecen los dedos con sus correspondientes carpos y metacarpos o tarsos y metatarsos dependiendo si nos referimos a la extremidad superior o inferior respectivamente (Fig. 4). Estos elementos, que en primer lugar se establecen como condensaciones mesenquimales, sufren un proceso de diferenciación transformándose en cartílago y en último lugar a hueso.

Los elementos esqueléticos de la extremidad, así como los tejidos conectivos provienen del primordio generado a partir del mesodermo lateral, sin embargo existen numerosos tejidos que surgen de otras localizaciones del embrión y que invaden el primordio con el objetivo de confeccionar una extremidad completa. Este es el caso de músculos y vasos sanguíneos, procedentes de los somitos (Ambler et al., 2001;

Chevallier et al., 1977; Christ et al., 1977), o de las terminaciones nerviosas, procedentes de las guías axonales que se desplazan desde del eje primario.



**Figura 4:** Inducción del primordio en el embrión de pollo. (A) En una etapa muy determinada y en lugares muy específicos del tronco del embrión un grupo de células mesenquimales indiferenciadas proliferan diferencialmente respecto del flanco. (B) Estas células junto con la capa de ectodermo que las recubre se denomina primordio, el cual establece una serie de centros de organización que permiten la formación de la extremidad en cada uno de los ejes espaciales (C). Los tres elementos que presenta la extremidad en el eje próximo-distal son el estilopodio, zeugopodio y autopodio (D).

Este mecanismo, por el que se constituyen las extremidades, opera de manera muy similar en la inmensa mayoría de los tetrápodos estableciendo, a pesar de las diferencias anatómicas y funcionales de cada especie, un esquema morfológico altamente conservado.

## 2.2 Posicionamiento e identidad de las extremidades

Los tetrápodos presentan dos pares de apéndices localizados a diferentes niveles a lo largo del eje antero-posterior. Así pues, en cuanto a la formación de las extremidades se refiere, la primera etapa determinante reside en concretar qué células a lo largo este eje van a dar lugar al primordio de la extremidad. La correcta localización de los denominados *limb fields* viene establecida, principalmente por una combinación específica de genes *Hox* expresados en el flanco (Capdevila and Izpisua Belmonte, 2001). Una vez que esta información posicional es interpretada, se produce un proceso conocido como inducción del primordio.

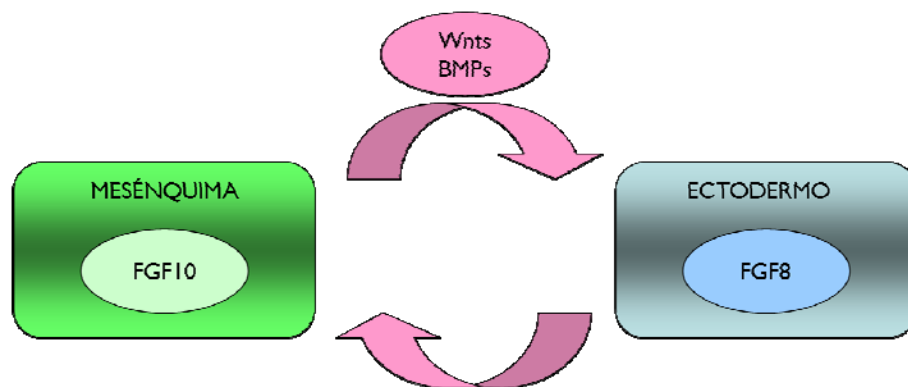
Aunque las extremidades superiores e inferiores se desarrollan siguiendo, básicamente, el mismo plan establecido, ambas estructuras han evolucionado de manera diferente para adaptarse a las necesidades de las distintas especies. Por ese motivo, si bien el

mecanismo molecular encargado de la formación de las extremidades superiores e inferiores comparte un alto grado de homología, existe un pequeño conjunto de genes que se expresan diferencialmente en una u otra extremidad. Este es el caso de *Tbx4*, *Tbx5* y *Pitx1* cuyo patrón de expresión (Logan, 2003), así como los ensayos realizados en el embrión de pollo (Logan and Tabin, 1999; Rodríguez-Esteban et al., 1999; Szeto et al., 1999; Takeuchi et al., 1999), sugieren un posible rol de estos factores confiriendo identidad a las distintas extremidades. Recientemente, estudios funcionales llevados a cabo en ratón (Agarwal et al., 2003; Minguillon et al., 2005; Rallis et al., 2003), analizando en detalle el papel de los genes *Tbx*, han contrastado fuertemente con los ensayos anteriores. Asimismo, trabajos similares han otorgado un papel esencial a *Pitx1* en este proceso (Lanctot et al., 1999; Szeto et al., 1999).

Por este motivo, aunque se ha estudiado en detalle el proceso por el cual las extremidades adquieren una identidad, resulta indudable que aún se desconoce el mecanismo molecular por el que se produce este fenómeno.

## 2.3 Inducción del primordio de la extremidad

Como hemos adelantado en apartados anteriores, el primordio de la extremidad aparece como un grupo de células mesenquimales indiferenciadas recubiertas por una envuelta de ectodermo. Sin embargo, para formar esta estructura, debe producirse un fenómeno de inducción en la que los factores de crecimiento fibroblástico o FGFs parecen tener un papel primordial. En el modelo de inducción que actualmente se baraja, FGF10, un factor secretado procedente del mesénquima subyacente, actuando a través del receptor de factores de crecimiento fibroblástico FGFR2, activaría una cascada de señalización en el ectodermo que finalizaría con la aparición de FGF8 en células específicas de este tejido y la formación del esbozo (Fig. 5 y Fig. 6).



**Figura 5:** Esquema representando las interacciones existentes entre el mesénquima y el ectodermo durante la inducción del primordio de la extremidad. Destacamos la presencia de un bucle de retroalimentación positiva entre FGFs producidos por estos tejidos.

A raíz de experimentos llevados a cabo a mediados de los 90, se postuló la existencia de un FGF, procedente de estructuras internas del eje primario del embrión, encargado de desencadenar el proceso de inducción de la extremidad. Esta hipótesis se estableció tras observar que la colocación en el flanco del embrión de pollo de microesferas impregnadas en FGFs promueven la inducción de un primordio ectópico (Cohn et al., 1995; Crossley et al., 1996; Ohuchi et al., 1997; Ohuchi et al., 1995; Vogel et al., 1996). La presencia de *Fgf8* en el mesodermo intermedio (IM) del embrión de pollo y ratón (Agarwal et al., 2003; Crossley et al., 1996; Vogel et al., 1996) a la altura de los *limb fields*, momentos antes de la inducción del primordio, convertían a este factor en un serio candidato a ser la molécula inductora. Sin embargo, aunque durante años se han realizado experimentos que, no sin cierta controversia, apoyan dicha hipótesis (Geduspan and Solursh, 1992; Kieny, 1970; Kieny and Dhouailly, 1969; Pinot, 1970; Stephens et al., 1993; Stephens and McNulty, 1981; Strecker and Stephens, 1983), recientes estudios llevados a cabo en el embrión de pollo mediante la colocación de barreras impidiendo activación de *Fgf8* en el IM (Fernandez-Teran et al., 1997), así como el fenotipo obtenido en mutantes de falta de función condicionales de *Fgf8* en este tejido (Boulet et al., 2004; Perantoni et al., 2005), parecen descartar este factor como responsable de la inducción del primordio.

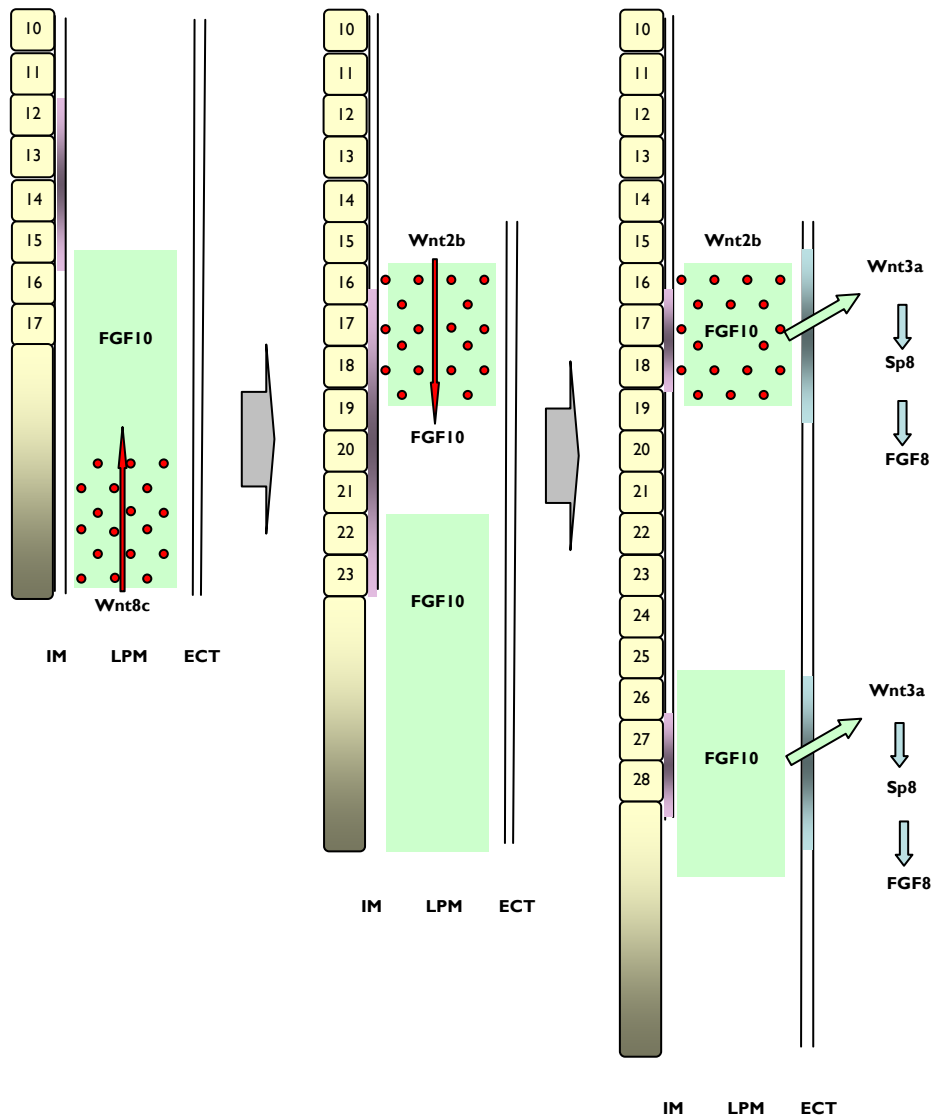
No obstante, la potente capacidad inductora que presentan los factores de crecimiento fibroblástico, así como la facultad de iniciar la cascada de inducción desde sus primeros pasos, sugieren la posibilidad de que otros *Fgfs* expresados a lo largo del eje rostro-caudal del embrión, pudieran ser los responsables del paso inicial de este proceso inductivo.

En esta última década se ha demostrado que miembros de la familia de los Wnts, *Wnt2b* y *Wnt8c*, manifiestan una capacidad inductora (Kawakami et al., 2001). *Wnt2b* y *Wnt8c*, a través de  $\beta$ -catenina, parecen los encargados de activar la expresión de *Fgf10* y de restringir dicha expresión a las regiones específicas de la placa de mesodermo lateral (LPM) donde se van a generar la extremidad superior e inferior respectivamente.

FGF10, es una molécula secretada, que actúa sobre el ectodermo prospectivo de la extremidad, activando una cascada de señalización en este tejido que resulta indispensable para la iniciación del primordio. Embriones mutantes *Fgf10*<sup>-/-</sup> carecen de primordio de la extremidad (Min et al., 1998) o presentan unos primordios insignificantes (Sekine et al., 1999). Por otro lado se ha demostrado mediante la aplicación de células que expresan altos niveles de *Fgf10* en el flanco del embrión de pollo, que esta molécula es capaz de inducir la formación de un primordio ectópico (Ohuchi et al., 1997).

El receptor FGFR2 media la señalización de FGF10 procedente del LPM ya que ratones que carecen de este receptor expresan *Fgf10* en el LPM pero son incapaces de inducir un primordio de manera apropiada (Arman et al., 1999; Lu et al., 2008; Xu et al., 1998; Yu and Ornitz, 2008).



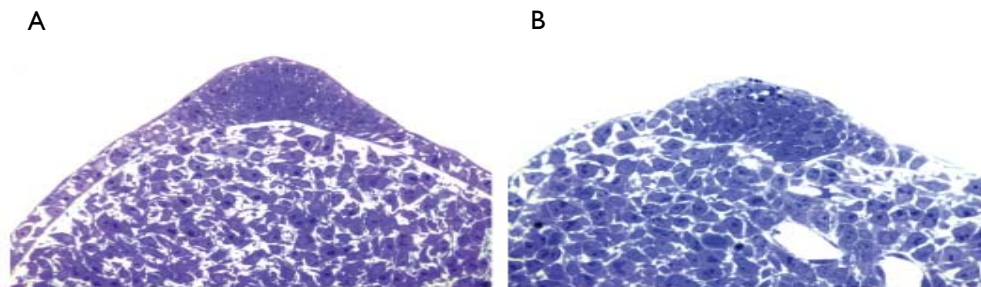


**Figura 6:** Inducción de la extremidad: En las primeras etapas de este proceso, factores (probablemente FGFs) procedentes de estructuras axiales promueven la expresión de *Wnt8c* y *Wnt2b*, encargados de activar y restringir la expresión de *Fgf10* a la región prospectiva de la extremidad inferior y superior respectivamente. La presencia de *Fgf10* provoca la activación de *Wnt3/Wnt3a* y *Sp8* en el ectodermo que desencadena la aparición de *Fgf8*, marcador de cresta ectodérmica apical. IM: Mesodermo intermedio. LPM: Mesodermo de la placa lateral. ECT: Ectodermo

## **2.4 La cresta ectodérmica apical (AER) y el crecimiento próximo-distal de la extremidad**

La inducción del primordio conlleva la formación de un centro de señalización conocido como la cresta ectodérmica apical. La cresta ectodérmica apical o AER es una banda de epitelio engrosado situada a lo largo del eje antero-posterior y localizada en el borde dorsoventral cuya función reside en promover el crecimiento en el eje próximo-distal.

Una característica que convierte a la cresta ectodérmica apical en un epitelio especial es su morfología. En el caso del embrión de pollo, este epitelio presenta una única capa celular columnar pseudoestratificada, mientras que en ratón muestra una disposición de epitelio poliestratificado. En ambos casos existe una fina capa de peridermo que la recubre (Fallon and Kelley, 1977; Fernandez-Teran and Ros, 2008; Goel and Jurand, 1975)(Fig. 7).



**Figura 7:** Morfología de la cresta ectodérmica apical (AER) en un primordio del embrión de pollo de estadio 20HH (A) y de ratón de estadio E10.5 (B) mostrando un epitelio pseudoestratificado y poliestratificado respectivamente (Fernandez-Teran and Ros, 2008).

Durante la formación de la cresta ectodérmica apical, este centro de señalización sufre una serie de cambios estructurales lo que le convierte en una estructura con alto grado de dinamismo (Fernandez-Teran and Ros, 2008). En el embrión de pollo, a estadio 18HH, algunas células del ectodermo distal comienzan a adoptar una morfología columnar que precede a la formación de un epitelio pseudoestratificado, totalmente obvio a estadio 20HH. A partir de estadio 24-25HH, el AER comienza a hacerse menos evidente, hasta que desaparece a 34HH aproximadamente (Milaire, 1974; Pautou, 1978; Todt and Fallon, 1984). En ratón, a estadio E9.5 las células procedentes del ectodermo ventral muestran cambios morfológicos, un pequeño alargamiento, que precede a la constitución de un ectodermo compuesto por dos capas celulares a E10. En estadio E10.5 el AER se sitúa en el borde dorso-ventral y muestra una conformación de epitelio cuboidal poliestratificado con tres o cuatro capas celulares (Milaire, 1974). Aunque estudios clásicos han demostrado que la estructura del AER no parece imprescindible para su funcionamiento básico, parece que podría estar implicada en controlar de manera adecuada la forma final de la extremidad, especialmente del autopodio (Fernandez-Teran and Ros, 2008).

La importancia del AER se demostró al observar que la eliminación de este centro de señalización, mediante microcirugía, en el embrión de pollo resulta en truncaciones de la extremidad a lo largo del eje próximo-distal. Además, la gravedad de la truncación obtenida depende, de manera progresiva, de la etapa de desarrollo en el cuál se realice la ablación de esta estructura. Si eliminamos el AER en estadios tempranos el número de elementos esqueléticos formados será menor que eliminando el AER más adelante, además este fenómeno sigue una secuencia próximo-distal (Lewis, 1975; Saunders, 1948; Summerbell, 1974; Summerbell, 1976)

Las moléculas que median la función de la cresta ectodérmica apical son los FGFs. Esto se comprobó tras la colocación de microesferas impregnadas en estos factores de crecimiento, las cuales eran capaces de rescatar el patrón normal de la extremidad en los ensayos de ablación anteriormente descritos (Fallon et al., 1994; Niswander et al., 1993)

#### **2.4.1 Inducción y mantenimiento de la cresta ectodérmica apical**

En este apartado trataremos de definir los mecanismos moleculares implicados en la inducción de la cresta ectodérmica apical así como su mantenimiento (Fig. 8).

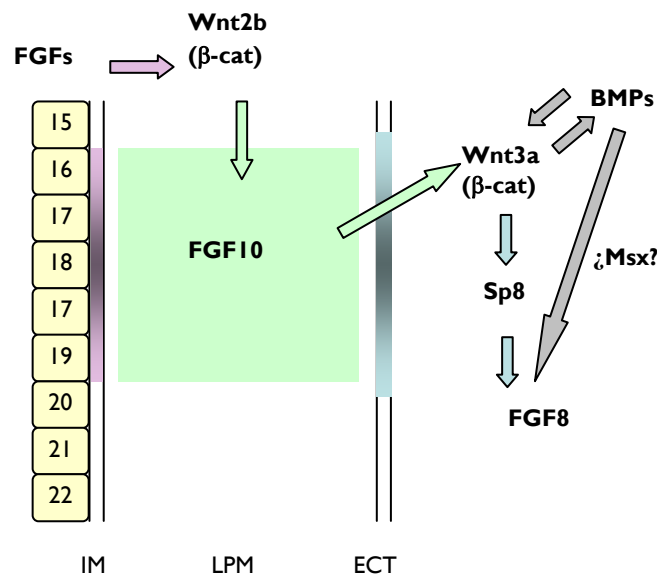
Definimos inducción del AER como el conjunto de pasos que provocan que una fracción determinada de las células del ectodermo, del recién generado primordio, se establezca como precursora de la cresta ectodérmica apical y comience a expresar *Fgf8*.

Tras la activación de FGFR2 por parte de FGF10 se desencadena una respuesta en el ectodermo en la que participa un miembro de la vía de Wnts, WNT3a en pollo y WNT3 en ratón. Ambas moléculas se expresan en el ectodermo prospectivo de la extremidad en etapas tempranas. Mientras que en el embrión de pollo, *Wnt3a*, se restringe a la cresta ectodérmica apical a medida que el primordio se desarrolla, en el embrión de ratón, *Wnt3* se mantiene en todo el ectodermo (Barrow et al., 2003; Kengaku et al., 1998).

Los siguientes ensayos en el embrión de pollo confirman la importancia de este gen en el proceso de inducción del AER. La sobreexpresión de *Wnt3a*, mediante virus, provoca la inducción de AERs ectópicos y la generación de parches de expresión de *Fgf8* en el ectodermo del primordio infectado. Por otro lado, la eliminación del AER y la posterior colocación de *pellets* celulares capaces de sobreexpresar *Wnt3a* promueven la activación de *Fgf8* en el ectodermo circundante (Kengaku et al., 1998).

La eliminación condicional de *Wnt3* en el ectodermo del embrión de ratón ha revelado que, en ausencia parcial de este gen, la expresión de *Fgf8*, aunque presente, se ve fuertemente afectada y el AER no se forma apropiadamente (Barrow et al., 2003). La presencia residual de *Fgf8* en los primordios de este mutante podría estar indicando que Wnt3 no es requerido para la inducción del AER. Sin embargo, la eliminación genética de componentes específicos situados *downstream* en la vía de Wnts, como son el mutante condicional de  $\beta$ -catenina en el ectodermo ventral del primordio y el doble mutante *Lef1/Tcf1*, no presentan niveles detectables de *Fgf8* (Barrow et al., 2003; Galceran et al., 1999; Soshnikova et al., 2003). De esta manera, parece probable que la eliminación genética de *Wnt3* llevada a cabo por Barrow y colaboradores podría no producirse en la totalidad del ectodermo.

Se considera que la expresión de *Fgf10* en el LPM es la responsable de la activación de *Wnt3a/Wnt3* en el proceso de inducción del AER (Kawakami et al., 2004; Kengaku et al., 1998). No obstante, en los últimos años se ha apuntado una vía paralela en la que dicha activación estaría mediada por la señalización por BMPs (Barrow et al., 2003; Soshnikova et al., 2003). Actualmente se contempla que ambas vías FGF10 y BMPs pudieran estar colaborando en la activación de *Wnt3/Wnt3a* durante el proceso de iniciación en la cresta ectodérmica apical.



**Figura 8:** Resumen de las cascadas genéticas implicadas en la inducción de la cresta ectodérmica apical. Como se puede apreciar FGFs, Wnts y BMPs juegan un papel primordial en este proceso. IM: Mesodermo intermedio. LPM: Mesodermo de la placa lateral. ECT: Ectodermo

Uno de los genes dianas de *Wnt3/Wnt3a*, aparentemente implicado en la activación de *Fgf8*, es *Sp8*. Este factor de transcripción de la familia de los dedos de zinc, se expresa en el ectodermo de la extremidad prospectiva del embrión de pollo, ratón y pez cebra inmediatamente después de *Wnt3/Wnt3a* (Bell et al., 2003; Kawakami et al., 2004; Treichel et al., 2003). Posteriormente este gen restringe su expresión principalmente a la cresta ectodérmica apical.

La sobreexpresión de *Sp8* en la extremidad de pollo promueve una elongación del AER así como una expansión de *Fgf8* en esta estructura (Kawakami et al., 2004) y ensayos de falta de función en esta especie, así como la inyección de morfolinós en embriones de pez cebra reducen ostensiblemente la expresión de *Fgf8* en el primordio (Kawakami 2004). Además, numerosos experimentos en pollo, ratón y pez cebra demostraron una activación de *Sp8* por parte de *Fgf10* y *Wnt3/Wnt3a/β-catenina*.

El patrón de expresión, así como los resultados funcionales y de regulación descritos, parecen indicar un papel primordial de *Sp8* en la inducción primaria de la cresta ectodérmica apical. Sin embargo los ratones mutantes homocigotos de falta de función de *Sp8* muestran defectos en el mantenimiento de la cresta ectodérmica apical y el sostenimiento de los niveles de *Fgf8*, pero los primeros pasos en el proceso de inducción, así como la expresión de *Fgf8*, se inician con normalidad (Bell et al., 2003; Treichel et al., 2003). Una posible explicación a este fenómeno podría ser la presencia en el primordio de *Sp9*, en un patrón solapante al mostrado por *Sp8*. Aunque se han demostrado ligeras diferencias en ensayos de regulación entre uno y otro gen, estudios de ganancia y pérdida de función en pollo muestran que las funciones de *Sp8* y *Sp9*

podrían ser idénticas. Además, la inyección simultánea de morfolinós específicos contra ambos genes en el embrión de pez cebra genera un fenotipo en la aleta pectoral con mayor grado de severidad que el observado al inyectarlos por separado, eliminado por completo la expresión de *Fgf8* desde sus inicios. De esta manera la presencia de *Sp9* podría compensar la ausencia de *Sp8* en los mutantes homocigotos *Sp8<sup>-/-</sup>* permitiendo la inducción de *Fgf8*.

Aparte de la vía anteriormente descrita, y como ya hemos adelantado, experimentos de ganancia y pérdida de función en el embrión de pollo y ratón han involucrado la vía de BMPs en el proceso de iniciación de la cresta ectodérmica apical (Ahn et al., 2001; Pajni-Underwood et al., 2007; Pizette et al., 2001). La eliminación genética del receptor BMPRI de todo el ectodermo del primordio o específicamente del AER del embrión de ratón antes de la formación de la extremidad provoca la ausencia de *Fgf8* en el primordio durante su desarrollo (Ahn et al., 2001; Pajni-Underwood et al., 2007). Además, la sobreexpresión en el ectodermo de una variante constitutivamente activa de este receptor, así como de *Noggin*, un inhibidor de BMPs (Pizette et al., 2001) producen similares resultados, apoyando un papel de esta vía en la inducción del AER. Los genes *Msx1* y *Msx2* han sido propuestos como mediadores entre la vía de BMPs (*Bmp2*, *Bmp4* y *Bmp7* expresados en el ectodermo) y la activación de *Fgf8* (Pizette et al., 2001). No obstante, en los últimos años se han revelado nuevos resultados concernientes al papel de las BMPs y los genes *Msx* en el proceso de inducción y parecen no apoyar dicho modelo (Lallemand et al., 2005; Wang et al., 2004). Por otro lado, se ha relacionado la vía de BMPs con la vía de Wnts/ $\beta$ -catenina en el proceso de inducción de la cresta ectodérmica apical (Barrow et al., 2003; Soshnikova et al., 2003). Sin embargo, actualmente existe cierta controversia en cuanto a la disposición relativa de ambas vías dentro de esta cascada de señalización.

Una vez iniciada la expresión de *Fgf8* en el AER, este factor difunde hasta el mesénquima donde es reconocido por los receptores FGFR1c y FGFR2c situados en esta región (Ornitz et al., 1996; Zhang et al., 2006). A continuación, la interacción de dichos receptores con las moléculas de FGF8 desencadena la activación de la vía de las MAP kinasas (Eblaghie et al., 2003; Kawakami et al., 2003), cascada que media la actividad anti-apoptótica y de bloqueo de diferenciación de este factor en el mesénquima.

Con el fin de asegurar el mantenimiento de la cresta ectodérmica apical durante el desarrollo del primordio, se genera un bucle de retroalimentación positiva entre el AER y el mesénquima subyacente. En este bucle, el FGF8 secretado por el AER es capaz de mantener la expresión de *Fgf10* en el mesénquima del primordio de la extremidad y provoca que este factor mesenquimal prolongue su acción sobre la vía de Wnts en el ectodermo. Asimismo *Sp8* junto con su homólogo *Sp9*, actúan de manera determinante en el mantenimiento de *Fgf8* (Bell et al., 2003; Kawakami et al., 2004; Treichel et al., 2003).

Una vez que el AER se establece, este centro de señalización no incorpora nuevas células y se convierte en una estructura autónoma, independiente y con un balance propio de proliferación/muerte con respecto al resto del ectodermo.

El mantenimiento del AER se prolonga durante 3 días aproximadamente a partir de los cuales sufre un proceso de regresión, que le lleva a mostrar una apariencia de epitelio simple cuboidal. Este proceso se estudiará en otro apartado posteriormente.

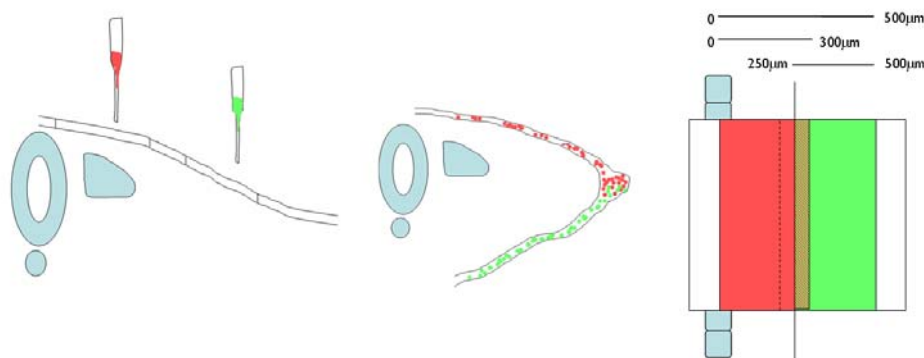
## 2.4.2 Localización y maduración de la cresta ectodérmica apical

El AER se localiza en la parte distal del primordio y, de manera muy precisa, en el borde de unión entre el ectodermo dorsal y ventral a lo largo de todo el eje antero-posterior. Una vez las células precursoras del AER se establecen en una zona determinada del ectodermo, por algún mecanismo no muy bien conocido, se reubican exactamente en el borde dorso-ventral. Aunque sigue siendo motivo de controversia, parece que para que se produzca este proceso, en el primordio de la extremidad se deben especificar un ectodermo dorsal y un ectodermo ventral que delimiten un borde donde el AER pueda restringirse.

### 2.4.2.1 El ectodermo de la extremidad y sus compartimentos

Primeramente analizaremos la organización del ectodermo del primordio, mostraremos como el ectodermo dorsal y ventral son compartimentos separados y como la cresta ectodérmica apical se sitúa en la frontera de ambos.

Altabef en 1997 llevó a cabo un mapeo de las células del ectodermo en el primordio prospectivo del embrión de pollo mediante marcaje con Dil y DiA (Altabef et al., 1997) (Fig. 9). En este experimento se pudo mostrar que durante el proceso de inducción de primordio del ala (13-16HH), el ectodermo prospectivo de la extremidad presenta una extensión de unas 500  $\mu\text{m}$  y que se expande desde la mitad de los somitos hasta las regiones más laterales la placa lateral. Por otro lado, marcajes realizados desde los somitos hasta una distancia de 300  $\mu\text{m}$ , se distribuían más tarde por todo el ectodermo dorsal y la totalidad del AER. De manera similar, los marcajes realizados de 250  $\mu\text{m}$  en adelante se localizaban en el ectodermo ventral y mitad ventral de la cresta ectodérmica apical.



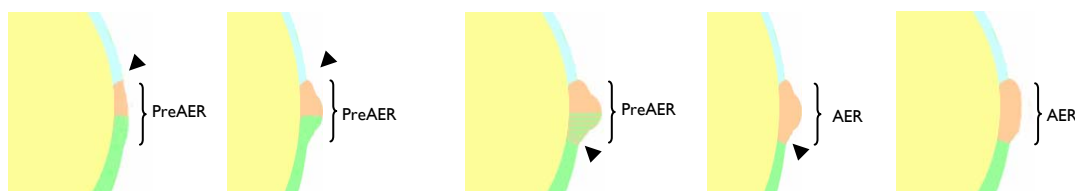
**Figura 9:** Representación esquemática de los experimentos realizados en el embrión de pollo por Altabef (Altabef et al., 1997). Marcajes en células del ectodermo prospectivo revelaron la existencia de un compartimento dorsal y otro ventral. Ambos compartimentos contribuyen a la formación de la cresta ectodérmica apical en primordio de extremidad de pollo.

A excepción de las células procedentes de ambos compartimentos encontradas en la mitad ventral de la cresta ectodérmica apical, no se observó violación de estos bordes. Sin embargo la presencia de esta mezcla de células en la mitad ventral del AER es motivo de controversia. Esto es debido a que en experimentos realizados mediante trasplantes interespecíficos pollo-codorniz (Michaud et al., 1997) los compartimentos alcanzaban su mitad correspondiente en la cresta ectodérmica apical respetando dicho borde.

De todos estos resultados se pudo evidenciar la presencia de un compartimento dorsal y ventral que coinciden en la cresta ectodérmica apical así como la contribución de células de ambos compartimentos a la constitución del AER.

En ensayos complementarios de mapeo mediante marcaje genético en el ectodermo del primordio del embrión de ratón (Guo et al., 2003; Kimmel et al., 2000) se llevó a cabo un análisis de la disposición de estas células a diferentes estadios (Fig. 10). Se pudo observar que el AER del embrión de ratón, a diferencia del embrión de pollo, se compone de células del pre-AER procedentes únicamente del ectodermo ventral (que no expresa marcadores dorsales). Además, se comprobó que tan sólo una fracción de las células que se establecen como pre-AER finalmente se determina para formar la cresta ectodérmica apical, mientras que el resto permanecen en el ectodermo ventral y acaban perdiendo la expresión de genes específicos de AER.

En estos experimentos se evidenció la existencia de dos bordes de compartimento en el ectodermo del primordio momentos antes de la formación de la cresta ectodérmica apical. El primer borde coincide con la expresión más distal de *Engrailed1* (*En1*) y se sitúa justo en la mitad del AER, dividiendo a este en dos mitades. Un segundo borde, solapante a la expresión más distal de *Wnt7a*, se localiza en el límite dorsal de la cresta ectodérmica apical. Estos bordes delimitarían tres compartimentos, el ectodermo ventral junto con la mitad ventral del AER (expresión de *En1*), la mitad dorsal del AER y el ectodermo dorsal (expresión *Wnt7a*).



**Figura 10:** Esquema mostrando los diferentes bordes establecidos en el ectodermo del primordio durante la formación de la cresta ectodérmica apical del embrión de ratón.

Antes de la inducción del AER, existe un borde dorsal y un borde dorso-ventral. Las células precursoras del AER (preAER) en naranja y verde se localizan ventralmente al borde dorsal. Una vez que una fracción de las células precursoras se establecen como AER, se delimita un nuevo borde ventral y desaparece el borde D/V, separando esta nueva estructura del ectodermo ventral y permitiendo la mezcla de las células del AER.

A continuación, una vez formado el AER, se genera un tercer borde en el límite ventral de la cresta ectodérmica apical que separa este centro de señalización del ectodermo ventral. Posteriormente, coincidiendo con el proceso de degeneración del AER, el borde que lo divide en dos mitades desaparece, permitiendo la mezclanza de células

de compartimentos diferentes. Este hecho, junto con los experimentos realizados por Michaud en 1997, parece indicar que la mezcla de células dorsales y ventrales en el AER del embrión de pollo que describió Altabef, pudiera ser provocada por una pérdida de este último borde a los estadios analizados.

Así pues, se advierte una diferencia muy evidente en el origen de la cresta ectodérmica apical entre el embrión de pollo y el embrión de ratón. En el primero, tanto el ectodermo ventral como dorsal, contribuyen a la constitución del AER mientras que en el segundo, únicamente el ectodermo ventral origina esta estructura.

En el bloque siguiente resumiremos los eventos genéticos que dan lugar a la generación de una asimetría dorso-ventral molecular en la extremidad de vertebrado.

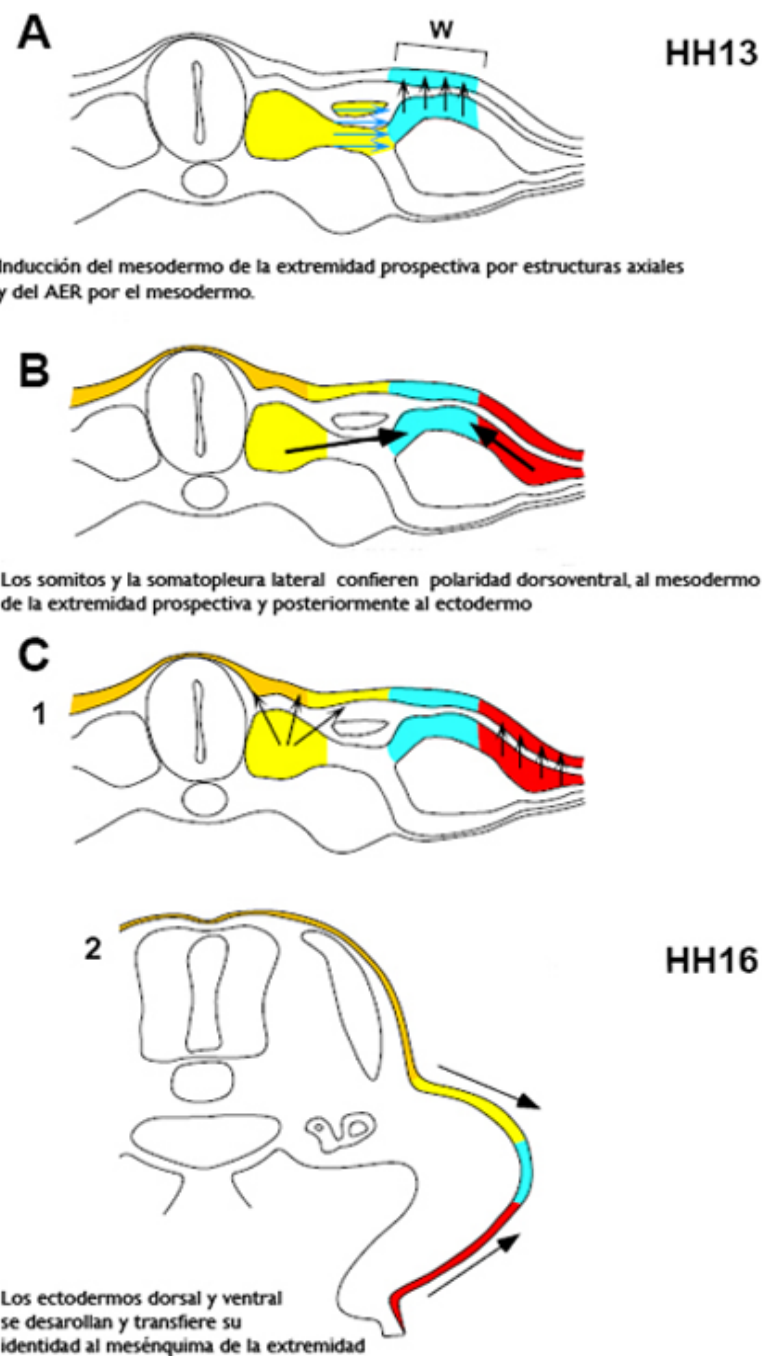
#### **2.4.2.2 El eje dorso-ventral y la localización del AER**

Además del eje próximo-distal y antero-posterior existe un tercer eje en la extremidad. Son evidentes las diferencias existentes entre la parte dorsal y ventral de nuestras manos. Esto se debe a que desde un estadio muy temprano en el desarrollo embrionario, se establece un eje dorso-ventral en el primordio prospectivo de la extremidad (Fig. 11 y Fig. 12).

Ensayos realizados en embriones de pollo mostraron que a estadios anteriores a 15-16HH la polaridad dorso-ventral no residía en el ectodermo (Geduspan and MacCabe, 1989; Michaud et al., 1997). Además constataron que la adquisición de un eje dorso-ventral de la extremidad proviene originariamente de señales procedentes de estructuras externas al primordio. Así pues, momentos antes de la inducción del primordio estas señales se transmiten al mesodermo y son adquiridas por el ectodermo prospectivo de la extremidad. Posteriormente, una vez el primordio se inicia, es el ectodermo el que transfiere la asimetría dorso-ventral al mesodermo de la extremidad en formación, estableciendo un patrón en este eje que se mantendrá hasta el final del desarrollo embrionario (Chen and Johnson, 1999) (Fig. 11).

Uno de los protagonistas es el factor de transcripción LMX1b. Estructuralmente, LMX1b posee dos dominios LIM (de unión a DNA), un homeodominio y un dominio de activación transcripcional (Curtiss and Heiling, 1998; German et al., 1994; Xue et al., 1993). Esta molécula presenta un patrón de expresión dinámico en el primordio de la extremidad, iniciándose en la totalidad del mesénquima y restringiéndose, más adelante, a su mitad dorsal. Ensayos de ganancia de función en pollo, demostraron que la expresión ectópica de *Lmx1b* en el mesodermo ventral, provee a esta región de rasgos dorsales (Riddle et al., 1995; Vogel et al., 1995), mientras que la inactivación de este gen en el embrión de ratón provoca que estos mutantes posean unas extremidades completamente biventrales (Chen et al., 1998). Además sabemos que alteraciones en la función de *Lmx1b* son responsables del síndrome uña-patela/uña-rótula en humanos (Dreyer et al., 2000).





**Figura 11:** Esquema que representa secciones transversales de embriones de pollo en las que se muestran las señales encargadas de la generación de un patrón dorso-ventral en la extremidad. Tal y como se puede apreciar, el origen de este patrón reside en estructuras externas al primordio (Modificado de Michaud et al. 1997)

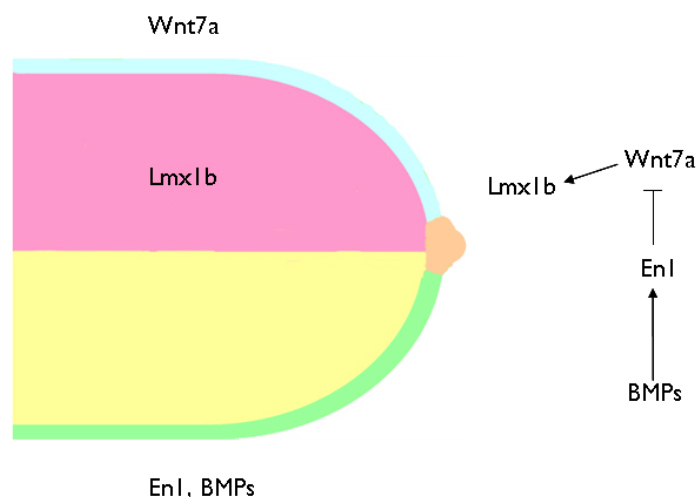
La restricción de este factor de transcripción al mesénquima dorsal del primordio viene provocada por la expresión en el ectodermo dorsal de *Wnt7a*. Este factor difusible, que actúa a través de una variante “no canónica” de la vía de Wnts (Kengaku

et al., 1998) actúa como elemento dorsalizante tal y como demuestran ensayos de ganancia y pérdida de función. Experimentos de sobreexpresión de *Wnt7a* en el ectodermo ventral del primordio de pollo, produce activación ectópica de *Lmx1b* en el mesénquima subyacente así como dorsalización de la extremidad (Riddle et al., 1995; Vogel et al., 1995), mientras que el mutante de falta de función exhibe extremidades doblemente ventrales (Parr and McMahon, 1995).

El patrón de expresión de *Wnt7a* restringida al ectodermo dorsal se debe a la activación en el ectodermo ventral de *Engrailed1* (*En1*). El factor de transcripción *En1* se expresa, tanto en ratón como en pollo, en el ectodermo ventral durante las primeras etapas en la formación del primordio para posteriormente extenderse hasta la mitad ventral de la cresta ectodérmica apical (Logan et al., 1997; Loomis et al., 1998).

La sobreexpresión de *En1* en el embrión de pollo provoca la formación de extremidades con elementos fusionados y una clara ventralización (Laufer et al., 1997; Logan et al., 1997; Rodríguez-Esteban et al., 1997). A estadios anteriores se demostró que el AER de estos especímenes presentaba un alto grado de desorganización y discontinuidad, con interrupciones a lo largo del eje antero-posterior así como duplicaciones mayoritariamente dorsales. Además, cuando se analizaron los primordios manipulados, se observó una ausencia tanto de *Wnt7a* en el ectodermo dorsal como de *Lmx1b* en el mesénquima dorsal. El mutante de falta de función de *En1* muestra una evidente dorsalización de sus extremidades provocada por una activación ectópica de *Wnt7a* y *Lmx1b* en territorios ventrales (Loomis et al., 1996; Loomis et al., 1998). Además dicho mutante exhibe una expansión ventral de la cresta ectodérmica apical responsable de la aparición de dígitos extra en la parte ventral del autopodio.

Estos ensayos sugieren un papel principal de *Engrailed1* en el correcto establecimiento del patrón dorso-ventral, así como de la generación de un borde que permita la localización, compactación y maduración del AER en el primordio de la extremidad de vertebrado.



**Figura 12:** Esquema que resume la vía de señalización responsable de otorgar identidad dorso-ventral a la extremidad. Alteraciones en este proceso provocan la aparición de extremidades bidorsales o biventrales.

Una de las primeras señales que muestran una expresión diferencial en el eje dorso-ventral del recién inducido primordio son las BMPs. En el embrión de pollo, *Bmp2*, *Bmp4* y *Bmp7* se expresan en el ectodermo ventral (Pizette et al., 2001) mientras que en ratón son únicamente *Bmp4* y *7* las que muestran un patrón, tanto mesenquimal como ectodérmico, restringido centralmente (Ahn et al., 2001).

Ensayos de ganancia de función en el embrión de pollo sobreexpresando el receptor BMPRI constitutivamente activo en el ectodermo revelaron una ventralización del primordio (Pizette et al., 2001). Por otro lado la sobreexpresión de *Noggin* en el ectodermo del embrión de pollo provoca la formación de primordios bidorsales (Pizette et al., 2001). Un efecto similar se pudo observar en el embrión de ratón al eliminar genéticamente *Bmpr1* en el ectodermo del primordio (Ahn et al., 2001) o al sobreexpresar *Noggin* en esta misma estructura (Wang et al., 2004).

En estos estudios se determinó que el rol de BMPs en la adquisición de una polaridad en el eje dorso-ventral viene mediado por una activación de *Engrailed1* en el ectodermo ventral por parte de esta vía. El exceso o la ausencia de *En1* en los ensayos tanto de ganancia como de pérdida de función en la vía de BMPs provocaron anomalías en la morfología del AER. Estas alteraciones se podrían producir principalmente por una carencia de borde dorso-ventral que habilitase una correcta estructuración del AER. Estos experimentos mostraron que, además de establecer un patrón dorso-ventral, la vía de BMPs resulta implicada tanto en la iniciación (véase inducción del AER) como en la localización y estructuración de la cresta ectodérmica apical.

Otros ensayos realizados en ratón han hecho plantearse una posible función de la vía canónica de Wnts en el establecimiento de una polaridad en el eje dorso-ventral. Mutantes de falta de función de  $\beta$ -catenina en el ectodermo del primordio carecen de expresión de *En1* en el ectodermo ventral y activan ectópicamente *Wnt7a* y *Lmx1b*, generando extremidades dorsalizadas y AERs aberrantes (Barrow et al., 2003; Soshnikova et al., 2003). Un resultado similar se observa en el doble mutante *Lef1*<sup>-/-</sup> *Tcf1*<sup>-/-</sup> (Galceran et al., 1999).

Por otro lado, la sobreexpresión de  $\beta$ -catenina en el primordio del embrión de pollo promueve la expresión de *Bmp2* (Kengaku et al., 1998) y la activación constitutiva de este factor es incapaz de rescatar el fenotipo en el eje dorso-ventral del mutante de ratón para BMPRI (Soshnikova et al., 2003). El conjunto de estos datos sugiere un papel principal de  $\beta$ -catenina, a través de la vía de BMPs, en la adquisición de un patrón dorso-ventral por parte de la extremidad así como en la correcta morfología y localización del AER.

Existen otros genes implicados en este proceso como es el caso de *Radical Fringe* (*R-fng*). Ésta es una molécula con actividad glicosiltransferasa, localizada en el aparato de Golgi, que se expresa en el ectodermo dorsal en el primordio de la extremidad del embrión de pollo (Laufer et al., 1997; Rodríguez-Esteban et al., 1997). *Fringe* (*fng*), el homólogo de este gen en *Drosophila*, establece un correcto posicionamiento del margen del disco imaginal del ala, centro de señalización que se ha postulado equivalente al AER en esta especie, modulando la interacción entre el receptor NOTCH y sus ligandos DELTA/SERRATE (Fleming et al., 1997; Panin et al., 1997).

La sobreexpresión de *R-fng* mediante virus en el ectodermo ventral del primordio provoca dos fenotipos diferentes, por un lado, una desorganización de la cresta ectodérmica apical con interrupciones y por otro extensiones ventrales que provocan truncaciones con elementos ectópicos (Laufer et al., 1997; Rodríguez-Esteban et al., 1997). En los casos de máxima infección en el ectodermo ventral se pudo observar una eliminación completa del AER, asociada a la aparición de elementos truncados a estadios de desarrollo posteriores. La morfología de las extremidades, en los pollos que sobreexpresan *R-fng* en el ectodermo ventral, es aparentemente normal en cuanto a la disposición de estructuras dorso-ventrales se refiere. En concordancia con estos resultados no existe variación de *Wnt7a* y *Lmx1b* en los primordios infectados. Aunque

en estos ensayos de ganancia de función, el patrón dorso-ventral permanezca inalterado, se ha demostrado que *R-fng* responde negativamente a la expresión ectópica de *En1* (Laufer et al., 1997; Rodríguez-Esteban et al., 1997). Es decir, la sobreexpresión de *En1* en el ectodermo dorsal reprime la expresión de *R-fng* impidiendo la adecuada ubicación del AER. La interpretación que se ha otorgado a estos datos reside en que la cresta ectodérmica apical requiere un establecimiento previo de un borde entre células *R-fng* positivas y negativas (establecido por *En1*), para su correcta disposición.

La ausencia de fenotipo en la extremidad en el mutante de falta de función de *R-fng* sugiere que la presencia de este gen no es requerida para la localización del AER en el embrión de ratón (Moran et al., 1999; Zhang, 1999). Esto apunta a la existencia de fuertes mecanismos de compensación para este gen en esta especie o bien a que el papel de *R-fng* en el desarrollo del primordio no se encuentra conservado entre estos dos modelos.

Otra molécula implicada en la formación de la cresta ectodérmica apical en el embrión de pollo es el receptor de factores de crecimiento epidérmicos EGFR, también conocido como ERBB1 o HER1 (Dealy et al., 1998; Omi et al., 2005). La expresión de este gen se detecta tanto en el mesénquima como en el ectodermo exceptuando al AER y su homólogo en *Drosophila* ha sido implicado en la formación del ala.

La sobreexpresión de una variante constitutivamente activa de *Egfr* llevada a cabo en el primordio del embrión de pollo provoca alteraciones en el patrón dorso-ventral, así como de organización de la cresta ectodérmica apical. En particular, el fenotipo observado corresponde, entre otras cosas, a una dorsalización parcial del primordio junto a un AER de bordes irregulares. Además se observó la generación de AERs extra, paralelos o perpendiculares, tanto en dorsal como en ventral, unidos al endógeno. No obstante, la posición de *Egfr* ocupada dentro de la cascada de establecimiento del eje dorso-ventral permanece inexplorada. Resulta curioso que una molécula con un patrón de expresión sin ningún tipo de restricción dorso-ventral en el primordio pueda tener un papel en la constitución de este eje. Sin embargo, se ha descrito una restricción ventral de su ligando EGF durante este proceso.

Aunque el papel en la formación de la extremidad de *Egfr* en el embrión de pollo resulta evidente, de manera similar a lo descrito para el gen *R-Fng*, el mutante de falta de función de este gen en ratón no presenta ninguna anomalía en el desarrollo del primordio (Miettinen et al., 1995; Sibia and Wagner, 1995; Threadgill et al., 1995). Este hecho podría indicar cierta redundancia funcional de *Egfr* con otras moléculas, capaces de subsanar la ausencia de este gen, o bien consistir en una diferencia interespecífica entre pollo y ratón.

En este apartado hemos proporcionado datos que sugieren una total dependencia entre el establecimiento de un patrón dorso-ventral y el posicionamiento y estructuración de la cresta ectodérmica apical. Sin embargo, aunque parece existir una correlación entre ambos procesos, aún desconocemos el grado de influencia y la magnitud de esta correlación.

### **2.4.2.3 Otros genes implicados en la localización del AER**

En el bloque anterior hemos descrito de qué manera se establece una polaridad dorso-ventral en el primordio de la extremidad así como la influencia de este proceso en la localización del AER. Sin embargo existen cascadas de señalización, independientes al

mecanismo de instauración del eje dorso-ventral, que regulan este apropiado posicionamiento y morfología de la cresta ectodérmica apical.

La vía de Notch juega un papel imprescindible en el margen del disco imaginal de ala de *Drosophila* y, de manera similar, controla la ubicación y la forma del AER en vertebrados. Existen dos miembros de esta vía que se expresan en el AER durante su formación, el receptor *Notch1* y su ligando *Serrate2/jagged2*. Tanto la falta de función completa de *Serrate2* en el embrión de ratón (Jiang et al., 1998), como la ablación genética de *Notch1* de manera condicional en el ectodermo del primordio de esta especie (Francis et al., 2005; Pan et al., 2005), provocan la aparición de un AER hipertrófico, extendido en el eje dorso-ventral y que protruye en dirección al mesénquima subyacente. Esta cresta ectodérmica apical aberrante provoca la aparición de sindactilias con fusiones tanto de tejido blando como de hueso en las falanges más distales de los dígitos centrales. De igual forma, el mutante *syndactylism*, que ha resultado ser un mutante hipomorfo de *Serrate2*, muestra un fenotipo similar en la extremidad (Sidow et al., 1997).

En el embrión de mosca, sabemos que la vía de Notch activa al factor de transcripción CUT durante el desarrollo del eje dorso-ventral del margen del disco imaginal del ala (Micchelli et al., 1997; Neumann and Cohen, 1996). *Cux1* es uno de los dos homólogos de *Cut* en pollo y se expresa en todo el ectodermo a excepción de la cresta ectodérmica apical durante el desarrollo del primordio (Tavares et al., 2000). De igual forma también se detecta expresión de este gen en los bordes de AERs generados ectópicamente mediante la sobreexpresión de  $\beta$ -catenina constitutivamente activa. Al realizar ensayos de ganancia de función con *Cux1* en el embrión de pollo, sobreexpresando este factor en todo el ectodermo, se mostraron interrupciones en la cresta ectodérmica apical. Además, las regiones aún conservadas del AER exhibían una morfología aberrante, revelando un aspecto más estrecho e irregular en el eje dorso-ventral. Este fenotipo durante la formación del primordio se traduce en extremidades con truncaciones a estadios posteriores (Tavares et al., 2000).

Otro gen implicado en la correcta localización y morfología del AER es *Dach1*. Este gen codifica para un factor de transcripción encargado de reprimir la vía de BMPs y se expresa en el AER y en el mesénquima del primordio en formación (Kida et al., 2004). Mediante la sobreexpresión en el ectodermo de una variante de este factor con función activadora en lugar de represora, se describieron anomalías en la formación de la cresta ectodérmica apical. El primordio formado presentaba un AER discontinuo y con trazado irregular que provocaba la aparición de truncaciones en los elementos distales (Kida et al., 2004). Ensayos de pérdida de función, electroporando en el mesénquima una forma dominante negativa de este gen, ocasionaron alteraciones en los bordes de los AERs endógenos, adoptando un aspecto poco uniforme (Kida et al., 2004). Estos datos en el embrión de pollo, junto con los conocidos en el homólogo en mosca (Mardon et al., 1994), indicarían un posible papel de *Dach1* en la formación de la extremidad en general así como del desarrollo de cresta ectodérmica apical en particular. No obstante, en experimentos de falta de función en ratón, el mutante *Dach1<sup>-/-</sup>* carece de fenotipo (Davis et al., 2001). Este hecho podría explicarse por la existencia de *Dach2*, en un patrón similar al observado para *Dach1*, el cual podría compensar la ausencia de su homólogo.

Otras publicaciones han demostrado el rol de *Dickkopf1* (*Dkk1*) en el desarrollo de la extremidad de vertebrado (Adamska et al., 2003; Adamska et al., 2004; Grotewold and Ruther, 2002; MacDonald et al., 2004; Mukhopadhyay et al., 2001). DKK1 es una proteína secretada capaz de inhibir la vía de Wnts a través de su interacción con el coreceptor de dicha vía, LRP6 (MacDonald et al., 2004; Mao et al., 2001; Zorn, 2001) y se sabe que en el primordio de la extremidad su activación responde a señalización por BMPs (Grotewold and Ruther, 2002; Mukhopadhyay et al., 2001). Esta molécula se expresa en el mesénquima de la zona necrótica anterior, en la zona necrótica posterior y en el AER durante el desarrollo del primordio. Si añadimos la expresión de este gen en la zona necrótica interdigital a estadios posteriores, este patrón observado reúne la mayor parte de las regiones de muerte celular programada masiva que se conocen en el primordio (Grotewold and Ruther, 2002; Mukhopadhyay et al., 2001). El mutante de falta total de función de este gen así como el mutante hipomorfo conocido como *doubleridge*, presenta un AER hiperplásico así como engrosado en el eje dorso-ventral (Adamska et al., 2003; Mukhopadhyay et al., 2001). El fenotipo más extremo muestra un AER que prácticamente se duplica, con dos bordes de alta expresión de *Fgf8* y una zona intermedia con menor intensidad. Los embriones posteriormente analizados manifiestan duplicaciones en los dedos 1 y 5 así como sindactilia.

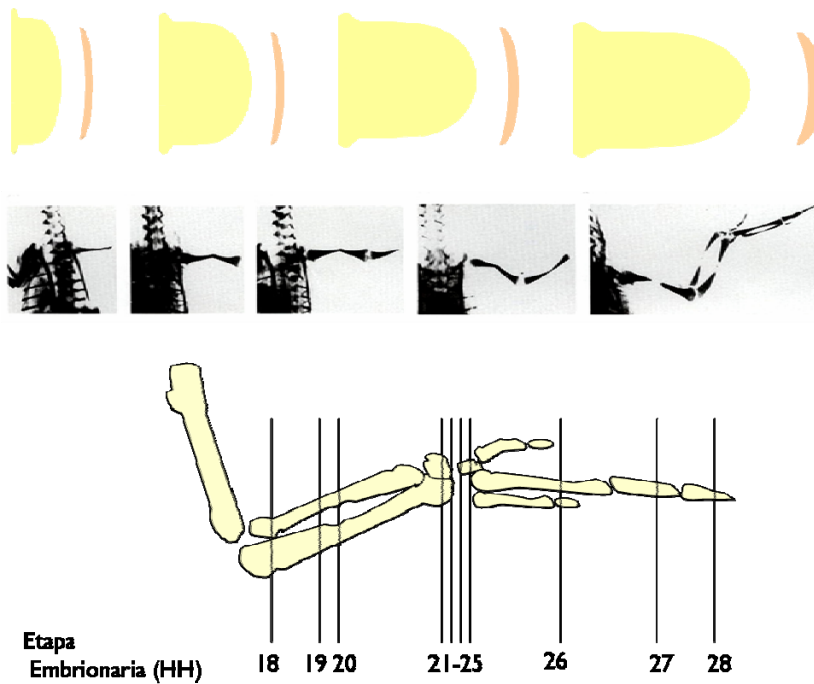
Recientemente se ha demostrado un papel *Megf/Lrp4* en la morfología y posicionamiento de la cresta ectodérmica apical. Este receptor de lipoproteínas de baja densidad se expresa en el AER y el ectodermo ventral durante el desarrollo del primordio y su mutante de falta de función en ratón muestra un AER ensanchado en el eje dorso-ventral. Este fenotipo origina duplicación y fusión de los dígitos a estadios posteriores (Johnson et al., 2005).

Como se ha descrito en este apartado, para un adecuado desarrollo de la extremidad se requiere una correcta morfología y localización de la cresta ectodérmica apical. Hemos analizado este mecanismo a nivel molecular y se ha podido esclarecer, en parte, el complejo entramado genético que lo gobierna. A continuación profundizaremos, más en detalle, en la funcionalidad del AER como centro de señalización y como estructura responsable del crecimiento próximo-distal de la extremidad.

### **2.4.3 Función de la cresta ectodérmica apical, FGFs y desarrollo del eje próximo-distal**

#### **2.4.3.1 Estudios clásicos**

Algunos de los primeros experimentos con el objetivo de conocer el papel de la cresta ectodérmica apical fueron realizados por Saunders en 1948. En estos ensayos, el AER se eliminaba quirúrgicamente en primordios de ala del embrión de pollo a diferentes estadios y la extremidad manipulada se dejaba desarrollar. El primer resultado que se observó es que la escisión de la cresta ectodérmica apical provocaba el cese del crecimiento del ala. Además se pudo mostrar que el nivel al cual la extremidad se truncaba era dependiente del estadio al cual se eliminase el AER (Fig. 13).

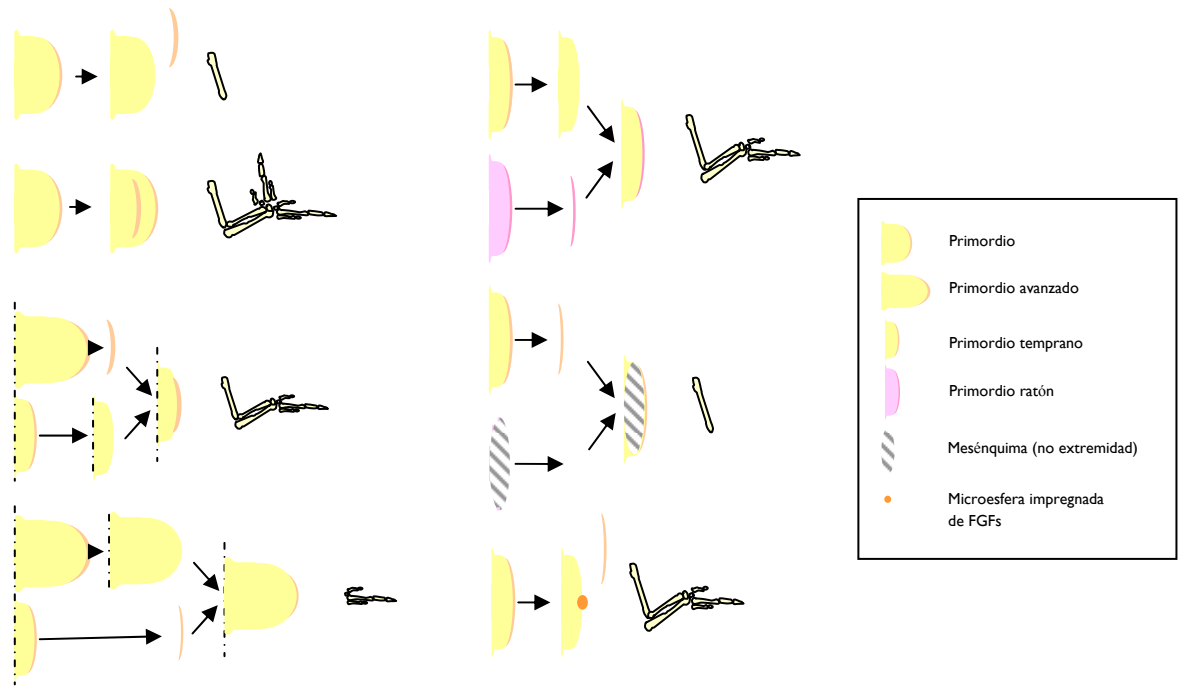


**Figura 13:** Esquema que sintetiza los experimentos realizados por Saunders en 1948. La eliminación quirúrgica de la cresta ectodérmica apical a diferentes tiempos provoca truncaciones a diferentes niveles. La escisión en etapas tempranas del AER produce truncaciones a niveles muy proximales, mientras que su escisión en etapas posteriores permite la formación de elementos cada vez más distales.

La ablación de este centro de señalización en primordios tempranos ocasionaba truncaciones a niveles muy proximales y únicamente se generaban los elementos más cercanos al tronco del embrión. De diferente manera, si esta escisión se llevaba a cabo en etapas más tardías, se obtenían truncaciones menos severas y se formaban extremidades con elementos cada vez más distales. Este ensayo demostró un papel primordial de esta estructura en la formación de la extremidad, especialmente en su desarrollo en el eje próximo-distal (Saunders, 1948).

En este mismo conjunto de modificaciones, se escindió la cresta ectodérmica apical en la región anterior, en la posterior y en pequeños parches discontinuos. El mesénquima del primordio únicamente mostró signos de crecimiento en los territorios que se ubicaban bajo las regiones intactas del AER. A lo largo de los años sucesivos, se realizaron manipulaciones similares con idénticos resultados (Gasseling and Saunders, 1961; Lewis, 1975; Summerbell, 1974; Summerbell, 1976; Summerbell et al., 1973). Por otro lado se observó que el trasplante de un AER al ectodermo dorsal de un primordio en formación provocaba la aparición de elementos ectópicos desarrollándose en la dirección de este nuevo eje, corroborando el papel de este centro de señalización en el crecimiento del mesénquima subyacente (Saunders JW, 1968). El grupo de Fallon, en 1982, quien descubrió la presencia de una región de muerte en el mesénquima distal en los primordios carentes de AER, otorgando a la cresta ectodérmica apical un papel antiapoptótico (Rowe et al., 1982).

Para ahondar más en el papel de la cresta ectodérmica apical, se realizaron trasplantes heterocrónicos en los que se combinaron AERs de individuos de estadios 23-25HH con mesénquimas de embriones de 18HH. Como resultado se obtuvieron extremidades completas (Rubin and Saunders, 1972). En un ensayo complementario se colocaron crestas ectodérmicas apicales de embriones tempranos con mesénquimas distales de primordios más desarrollados. Se mostró que las extremidades resultantes presentaban únicamente los elementos del autopodio.



**Figura 14:** Resumen de los experimentos que demuestran el papel de la cresta ectodérmica apical en el mesénquima subyacente. Los resultados obtenidos indican

- Un papel permisivo del AER durante el desarrollo de la extremidad de vertebrados.
- Una interacción mesénquima-ectodermo específica del primordio de la extremidad.
- La señalización por FGFs aporta a la cresta ectodérmica apical la mayor parte de sus funciones.

Estos resultados señalaron un papel permisivo, por parte del AER, en el crecimiento de la extremidad y en la formación del patrón próximo-distal (Fig. 14).

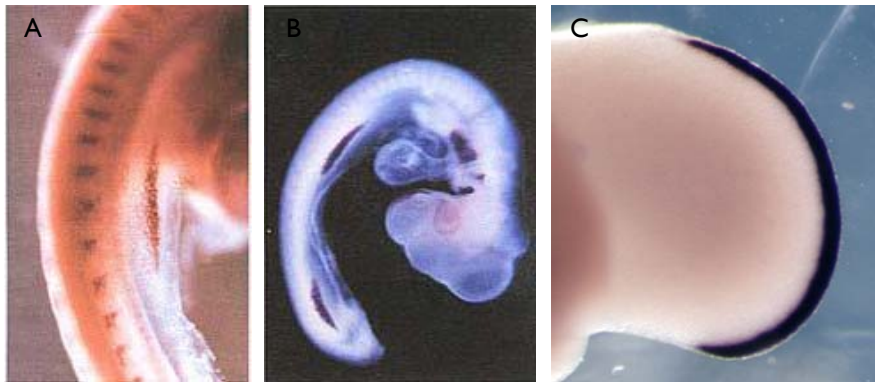
Paralelamente, se recombino mesénquima correspondiente a un primordio de ala con un AER perteneciente a un primordio de pata y la extremidad obtenida resultó ser un ala (Rubin and Saunders, 1972). De manera similar este mismo ensayo se realizó con mesénquima procedente de primordio de pollo y un AER de ratón, desarrollándose una extremidad de pollo (Kuhlman and Niswander, 1997). Por otro lado, la recombinação de un mesodermo correspondiente a una región embrionaria cualquiera (excepto del primordio) con una cresta ectodérmica apical, provoca la desaparición del AER y ningún elemento cartilaginoso es generado (Rubin and Saunders, 1972). De esta manera se dedujo que el papel permisivo del AER no era dependiente del tipo ni de la naturaleza del mesénquima del donante, siempre que su origen residiese en el primordio. Asimismo se determinó que entre este epitelio especializado y el mesénquima de la extremidad se mantiene una interacción recíproca en la que ambos tejidos requieren la presencia del otro para su supervivencia. Así pues, mientras que la cresta ectodérmica apical es capaz de mantener la capacidad proliferativa y evitar la diferenciación de una región distal de células localizada en el mesénquima subyacente, a su vez este tejido promueve la supervivencia del AER. Implicada en este último paso, se postuló la existencia de un AEMF o factor de mantenimiento del AER, molécula mesenquimal específica del primordio, encargada de fomentar la conservación de esta estructura.



#### 2.4.3.2 Los factores de crecimiento fibroblásticos o FGFs

Existen numerosos genes que se expresan en la cresta ectodérmica apical. De entre todos ellos, los factores de crecimiento fibroblástico o FGFs son los que parecen inferir al AER la mayor parte de sus funciones. Esto quedó demostrado cuando, mediante la aplicación de microesferas impregnadas en FGF2, 4 y 8, se rescató de manera mayoritaria el fenotipo en la extremidad provocado por la escisión del AER (Fallon et al., 1994; Niswander et al., 1993).

De la veintena de FGFs que se conocen en la actualidad, sólo cuatro (*Fgf8*, *Fgf4*, *Fgf9*, *Fgf17*) se expresan en la cresta ectodérmica apical del primordio de la extremidad en ratón y pollo (revisado por Fernandez-Teran and Ros, 2008). *Fgf8* comienza a expresarse en todo el AER de manera muy temprana coincidiendo con la inducción de las células precursoras de la cresta ectodérmica apical. Posteriormente, correspondiendo con la desaparición de esta estructura, *Fgf8* se apaga (Crossley and Martin, 1995). Por estos motivos, *Fgf8* es considerado el marcador de cresta ectodérmica apical por excelencia y su presencia es considerada como sinónimo funcional de AER (Fig. 15).



**Figura 15:** Hibridación *in situ* que muestra la expresión de *Fgf8* en la cresta ectodérmica apical del embrión de pollo a diferentes estadios. (A-C) *Fgf8* comienza a expresarse en las células del preAER, para posteriormente localizarse en este centro de señalización. Modificado de (Gilbert)

Por su parte los primeros niveles detectables de *Fgf4*, *Fgf9* y *Fgf17* en el AER se producen después de la inducción de éste. Su patrón de expresión comprende la región posterior de la cresta ectodérmica apical y se deja de detectar casi un día antes de la desaparición del AER (Sun et al., 2000).

Los embriones mutantes de falta de función para *Fgf9* y *Fgf17* generan extremidades sin ningún tipo de alteración en el patrón esquelético (Colvin et al., 2001a; Colvin et al., 2001b; Xu et al., 2000). Los mutantes de pérdida de función de *Fgf4* y *Fgf8* resultan letales en etapas muy tempranas antes de la formación del primordio (Feldman et al., 1995; Sun et al., 1999), de manera que el estudio de estos genes en esta estructura se ha tenido que llevar a cabo mediante un abordaje condicional. Esta eliminación génica viene dada por la expresión de la recombinasa Cre bajo el promotor de *Msx2*, marcador de AER, entre otros. Este gen comienza a expresarse en la extremidad inferior antes de la inducción del AER mientras que en la extremidad superior

comienza a detectarse momentos después de esta iniciación. Por esta razón la inactivación de los alelos floxeados se producirá a diferentes tiempos dependiendo si hablamos de la extremidad superior o inferior. La inactivación de *Fgf4* en el AER, al igual que la eliminación de *Fgf9* y *Fgf17*, no provoca anomalías a destacar en el patrón esquelético de la extremidad (Moon et al., 2000; Sun et al., 2000). Es más, el triple mutante de falta de función para estos tres genes presenta unas extremidades completamente normales (Mariani et al., 2008), mientras que la ablación genética de *Fgf8* ocasiona defectos considerables (Lewandoski et al., 2000; Moon and Capecchi, 2000). La extremidad superior de estos mutantes (eliminación de FGF8 después de la iniciación del AER) muestra la ausencia de un dígito. Sin embargo, en la extremidad inferior de estos embriones se pudo observar que, la ausencia de *Fgf8* antes de la inducción del AER, además de la presencia de sólo cuatro dígitos en el autopodio, provoca la desaparición del estilopodio. Estos datos, en conjunto, indican que la expresión de *Fgf8* por parte de la cresta ectodérmica apical es suficiente para un adecuado desarrollo de la extremidad.

Para determinar las funciones del resto de estos FGFs se llevó a cabo una eliminación de cada uno de estos factores en combinación con la inactivación condicional de *Fgf8*. Estos experimentos demostraron que el requerimiento por parte del mesénquima de la señalización por FGFs generada en el AER parece absoluto. Además, revelaron la existencia de diferentes categorías en estos factores, según el grado de importancia en el establecimiento del patrón próximo-distal. De mayor a menor jerarquía, en primer lugar *Fgf8*, en segundo lugar *Fgf4*, a continuación *Fgf9* y por último *Fgf17*.

Desde los primeros estudios realizados en el AER, se ha abogado por un papel permisivo más que instructivo en la formación de un patrón próximo-distal. Según esta teoría los *Fgfs* expresados en el AER, así como la propia estructura mantenían un papel meramente antiapoptótico y de mantenimiento de un estado indiferenciado en el mesénquima distal. Sin embargo, de manera muy reciente, se han otorgado otros roles a la cresta ectodérmica apical y a sus FGFs. Analizando el fenotipo de los mutantes de falta de función condicionales de *Fgf2* en el AER se postuló que estos factores podrían estar coordinando el balance proliferación/diferenciación del mesénquima distal (Yu and Ornitz, 2008). Curiosamente, utilizando dicho mutante, otro grupo distinto interpretó de manera diferente los resultados obtenidos, proponiendo un rol del AER en la regulación del número de progenitores del autopodio (Lu et al., 2008). Posteriormente, mediante el estudio de los mutantes de *Fgfs* anteriormente descritos se ha planteado la posibilidad de que estos factores puedan jugar un papel instructivo en el establecimiento de un correcto patrón próximo-distal (Mariani et al., 2008).

#### **2.4.4 Establecimiento del patrón en el eje próximo-distal**

Actualmente se barajan dos principales modelos por los cuales se explica la adquisición de un patrón próximo-distal por parte de la extremidad en desarrollo. El modelo de la zona de progreso, postulado en 1973 por el laboratorio de Wolpert (Summerbell et al., 1973) y el de especificación temprana propuesto por el grupo de Tabin (Dudley et al., 2002). A día de hoy no existe un consenso sobre cual explica en mayor medida la formación del patrón próximo-distal, ya que existen experimentos que parecen apoyar a uno y a otro.

#### **2.4.4.1 El modelo de la zona de progreso (Summerbell 1973)**

En este modelo se propone la existencia de una región de mesénquima indiferenciado de un tamaño fijo y constante (unos 300µm de espesor) situado de manera subyacente a la cresta ectodérmica apical denominada zona de progreso. Esta región, se mantiene bajo la influencia de señales provenientes del AER lo que le proporciona ese estado indiferenciado y de continúa proliferación. El modelo propone la existencia de un reloj molecular interno capaz de computar el tiempo que pasan en esta región. De esta forma las células de la zona de progreso adquirirían identidades más distales cuanto más tiempo se encuentren bajo la influencia del AER. A medida que el primordio se desarrolla, las células se dividen y abandonan la zona de progreso, alejándose de la influencia del AER y quedando especificadas en el eje próximo-distal para posteriormente diferenciarse. Las primeras células en abandonar esta región se especifican para dar lugar a estructuras proximales y de manera progresiva, las siguientes células irán especificándose para producir estructuras cada vez más distales (Fig. 16). Dicho modelo se apoya en este conjunto de experimentos:

- En experimentos de escisión mediante cirugía de la cresta ectodérmica apical en el embrión de pollo, los elementos obtenidos resultan más distales cuánto más tarde se elimine el AER (Gasseling and Saunders, 1961; Lewis, 1975; Saunders, 1948; Summerbell, 1974; Summerbell, 1976; Summerbell et al., 1973). El modelo de la zona de progreso explica dicho resultado asegurando que los elementos se van estableciendo a lo largo del tiempo en el eje próximo-distal. De dicha forma, en los primordios que se elimina el AER de forma muy temprana, los elementos especificados en ese momento corresponden a los segmentos más proximales. Escisiones cada vez más tardías permitirían la especificación de estructuras cada vez más distales.
- La sustitución de zonas de progreso de primordios en estadios tardíos por zonas de progreso de primordios tempranos provoca la aparición de extremidades con todos los elementos esqueléticos provenientes del trasplante. Este hecho, parece indicar que, ni es necesaria la presencia de una señal difusible desde el flanco, ni existe ningún tipo de modulación por parte de los elementos formados a la hora de establecer un patrón próximo-distal a lo largo del eje (Summerbell et al., 1973).
- Tras la irradiación con rayos X de un primordio temprano, las extremidades generadas únicamente forman las estructuras distales, mientras que las más proximales no se generan o aparecen severamente reducidas (focomelia). Desde este modelo, el resultado se explica sugiriendo que las células supervivientes tras la irradiación (un alto porcentaje muere), al tener que repoblar esta zona de progreso, deben emplear más tiempo hasta alcanzar un número suficiente de células. Durante este tiempo las células permanecen en esa región pero su reloj interno distalizante continúa avanzando. Así pues, cuando abandonan la zona de progreso presentan una especificación más distal que la que les hubiese correspondido de no haberse producido tal irradiación (Wolpert et al., 1979).

#### **2.4.4.2 El modelo de especificación temprana (Dudley 2002)**

Este modelo plantea la existencia en el primordio temprano de precursores para cada uno de los tres elementos del eje próximo-distal: Estilopodio, Zeugopodio y Autopodio. Estos precursores, que estarían claramente especificados desde etapas muy tempranas, se dispondrían por capas o estratos independientes y se expandirían secuencialmente para dar lugar a cada uno de los segmentos de la extremidad (Fig. 16). Este modelo se propuso tras la realización de los siguientes experimentos:

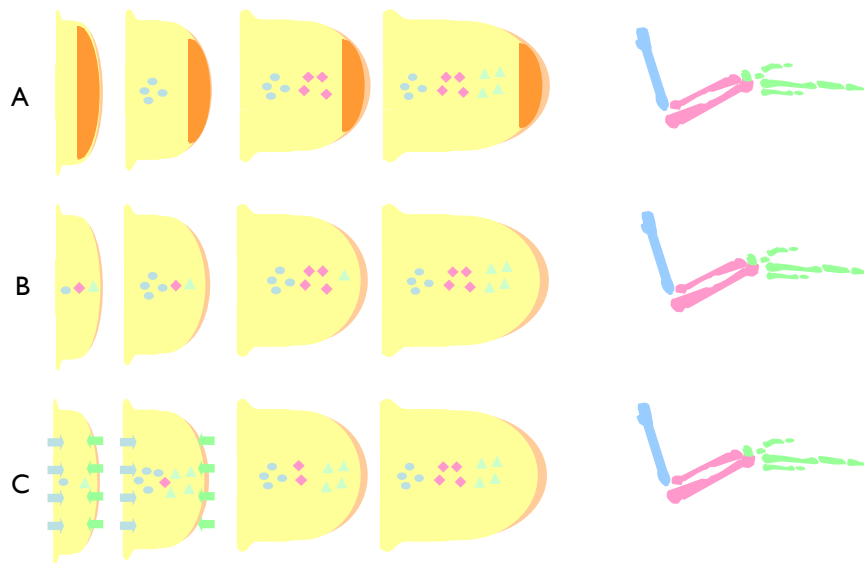
- Se llevaron a cabo marcajes con colorantes lipofílicos del mesénquima distal de primordios tempranos en el embrión de pollo. Curiosamente las células marcadas siempre contribuían a un único segmento. A una distancia entre 0 y 100µm del AER contribuían a la formación del autopodio, entre 100-200µm, al zeugopodio y entre 200-300µm, al estilopodio.
- De manera similar a Summerbell, se sustituyó el mesénquima distal de primordios de estadios avanzados por las últimas 100µm del mesénquima distal de un primordio temprano. En este caso sólo se formaron estructuras pertenecientes al autopodio. Recordemos que Summerbell transplantaba regiones de aproximadamente 300µm.

Además, los autores de este modelo reinterpretaron los resultados observados en los experimentos clásicos de escisión del AER ya que demostraron que tras la eliminación quirúrgica del AER se producía una región de alta muerte celular que se extendía, de manera invariable, hasta unos 200µm del AER. Acorde con estos datos, este grupo propuso que este incremento de apoptosis en esa región podía ser responsable de la eliminación, en estos experimentos, de los segmentos distales ya especificados.

#### **2.4.4.3 Controversia entre el modelo de la zona de progreso y el de especificación temprana**

Los modelos anteriormente expuestos han recabado las miradas de la inmensa mayoría de los científicos que estudian el desarrollo de la extremidad a lo largo de los últimos años. Parece evidente que hay cierto número de experimentos que no resultan fácilmente explicables a partir de ninguno de los dos modelos por lo que se ha generado una gran controversia. No obstante en los últimos años se han revelado ciertos resultados que parecen clarificar de algún modo el debate. Ensayos mucho más exhaustivo de marcajes con colorantes lipofílicos en el primordio del ala del pollo, parecen indicar que, al menos entre el zeugopodio y el autopodio, no existe ningún tipo de restricción a estadios iniciales (Sato et al., 2007). Por otro lado marcajes genéticos a nivel celular en el embrión de ratón (Arques et al., 2007) parecen confirmar la ausencia de compartimentos y precursores establecidos para los tres segmentos en el primordio temprano. Estos resultados no apoyan la existencia de una especificación temprana, al menos de forma irreversible, en el primordio de la extremidad de vertebrado. Además, mapas de destino detallados llevados a cabo mediante la infección por retrovirus en el primordio temprano del embrión de pollo, han llevado a los propios autores del modelo de especificación temprana, a desmentir su modelo en su versión más estricta (Pearse et al., 2007).

Como conclusión se puede decir que, aunque ambos modelos explican con cierta solvencia algunos de los experimentos realizados hasta la fecha, no son capaces de justificar todos y cada uno de estos ensayos. Sin embargo su mayor defecto probablemente no resida en este hecho, sino más bien en la ausencia de marcadores moleculares capaces de reconocer los distintos elementos próximo-distales y que inequívocamente identifiquen la especificación de los mismos a nivel molecular.



**Figura 16:** Modelos de especificación del eje próximo-distal:

- a) Modelo de la zona de progreso: El tiempo que una célula permanece en esta región de células indiferenciadas determina su identidad próximo-distal
- b) Modelo de especificación temprana: La identidad próximo-distal de cada célula viene especificada desde etapas muy tempranas en el primordio.
- c) Modelo de las dos señales: La identidad de las células del primordio viene determinada por la presencia de dos señales provenientes del AER y del tronco del embrión.

#### 2.4.4.4 Otros modelos

Tanto el modelo de la zona de progreso, como el modelo de la especificación temprana otorgan a la señalización originada en el AER un papel meramente permisivo en el establecimiento del eje próximo-distal. En el primer caso, el AER se encargaría de mantener el estado anti-apoptótico de las células en el mesénquima subyacente. De esta manera, el AER provocaría tanto que las células mantengan activo su reloj interno como un aumento del número celular en la zona de progreso causando la salida de las células de esta región y su consecutiva especificación.

En el modelo de especificación temprana, la señalización proveniente de la cresta ectodérmica apical se encargaría también de evitar la muerte celular y promover la proliferación de las células del mesénquima. Sin embargo, la finalidad sería el expandir

el conjunto de precursores de cada uno de los segmentos preexistentes en el primordio temprano.

Muy recientemente el grupo de Gail Martin ha elaborado un modelo en el cual el AER tendría un papel instructivo en la formación del eje próximo-distal. Este modelo, cimentado en el de especificación temprana, fue propuesto basado en la siguiente observación (Mariani et al., 2008). La eliminación genética de dos *Fgfs*, *Fgf8* y *Fgf9* en la cresta ectodérmica apical después de la inducción del AER provoca que el dominio distal del primordio (negativo para el marcador proximal *Meis1*) adquiera un tamaño inferior que los observados en los individuos control. Además este fenotipo se agrava en mutantes *Fgf8/4/9<sup>+/-</sup>*. Este dato sugiere un rol más que permisivo del AER y sus señales en el patrón próximo-distal de la extremidad. Curiosamente el primordio de estos mutantes muestra una región de muerte celular programada en el mesénquima proximal, resultado muy diferente del observado al eliminar el AER quirúrgicamente. Con estos datos y adoptando el modelo de la especificación temprana como base, este grupo elabora un nuevo modelo al que denominan *modelo de las dos señales*. Aquí se postula la presencia de una señal proximal procedente del mesodermo del flanco (posiblemente el ácido retinoico) y una señal distal perteneciente al AER (FGFs) que establecen dos dominios en el primordio temprano, uno proximal y otro distal, respectivamente. El segmento intermedio que originaría el zeugopodio se establecería posteriormente en el borde de unión entre estos dos dominios (Fig. 16). Un modelo similar ya había sido previamente propuesto por el grupo de Miguel Torres en el año 2000 (Mercader et al., 2000).

El modelo de las dos señales explicaría por qué en el mutante *Fgf8/4/9<sup>+/-</sup>* se observan elementos del estilopodio y del autopodio pero carece de zeugopodio. Así mismo daría interpretación a los fenotipos observados en los diferentes mutantes de *Fgfs* en el AER (Boulet et al., 2004; Lewandoski et al., 2000; Moon and Capecchi, 2000; Sun et al., 2002), así como los estudios de marcaje realizados en el primordio de pollo (Sato et al., 2007). Sin embargo, el modelo de las dos señales resulta incapaz de explicar otros resultados y carece de marcadores de los diferentes segmentos o dominios a estadios tempranos, de manera que resulta, al igual que los anteriores, incompleto.

#### **2.4.5 Muerte y regresión del AER**

Una vez que el patrón próximo-distal en la extremidad se ha establecido y se observan todas y cada una de las condensaciones que dan lugar a este apéndice, el AER, y la expresión de *Fgf8* se dejan de detectar.

En este proceso denominado regresión, el AER comienza a aplanarse y a alcanzar una estructura de monocapa simple indistinguible del resto de ectodermo del primordio. Además, se ha descrito que la cresta ectodérmica apical durante su regresión sigue un patrón, desapareciendo previamente en la parte distal de los interdógitos, para a continuación extinguirse en la punta de los dedos (Jurand, 1965; Milaire, 1974; Wanek et al., 1989). Curiosamente esta desaparición se produce primeramente en los dedos más anteriores y de manera paulatina alcanza a los más posteriores (Ganan et al., 1998).

Aunque morfológicamente se conocía el proceso de regresión del AER y se comprendían algunos de los mecanismos que lo controlaban, hasta hace algunos años

no se determinó cuál era el destino exacto de las células del AER. Mapas de destino en el embrión de ratón, mediante la utilización de líneas Cre bajo el promotor de un marcador de AER, confirmaron que la cresta ectodérmica apical era una estructura transitoria (Guo et al., 2003). Se determinó que, tras su inducción y mantenimiento durante 72 horas, las células del AER adquieren una conformación de monocapa cuboidal simple y van siendo eliminadas progresivamente. Asimismo, las células del pre-AER que finalmente no forman parte de este centro de señalización se incorporan al ectodermo ventral de la punta de los dedos (Guo et al., 2003).

Dichos resultados junto con las altas tasas apoptóticas del AER (Fernandez-Teran et al., 2006; Jurand, 1965; Todt and Fallon, 1984) sugieren que el posible balance descompensado entre proliferación/muerte que se produce en la cresta ectodérmica apical podría ser el mecanismo fundamental por el que el AER desaparece. La vía de las BMPs aparece implicada en numerosos procesos embrionarios mediando apoptosis, por este motivo, parece comprensible, que esta sea la principal cascada molecular directamente relacionada con el proceso de desaparición del AER. Ensayos en los que se sobreexpresa *Noggin* (inhibidor de BMPs) en el ectodermo del primordio del embrión de pollo provoca una prolongación en la vida de la cresta ectodérmica apical endógena (Pizette and Niswander, 1999). Además estos AERs muestran una morfología hiperplásica, debido a la disminución en su tasa apoptótica producida tras la sobreexpresión. Este fenotipo en el primordio se traduce posteriormente en sobrecrecimientos de tejido blando en la parte distal de los dedos y una marcada sindactilia.

Idénticos resultados se han obtenido al generar una línea transgénica de ratón capaz de sobreexpresar *Noggin* bajo un promotor de cresta ectodérmica apical (Wang et al., 2004) o al eliminar el receptor BMPRIa del AER tras la inducción de esta estructura (Pajni-Underwood et al., 2007). Experimentos recientes han demostrado que al disminuir la cantidad de FGFs producida por el AER, mediante la eliminación de alelos de *Fgf8* o *Fgf4*, en el mutante de *Bmpria*, se ha conseguido erradicar la sindactilia de este ratón (Pajni-Underwood et al., 2007). Este resultado parece colocar al exceso de señalización por FGFs como principal responsable de la sindactilia.

Estos datos, en conjunto, sitúan a la señalización por BMPs (probablemente, la mayoría procedente de los interdígitos) como partícipe de la correcta regresión de la cresta ectodérmica apical en el primordio de la extremidad de vertebrados.

## **2.5 La zona de actividad polarizante y el eje antero-posterior**

El hecho de que los dedos de nuestras manos sean distinguibles unos de otros demuestra la existencia de un patrón antero-posterior durante el desarrollo embrionario. Esta evidencia resulta aún más incuestionable si observamos las extremidades de otros organismos como por ejemplo las aves. Asimismo existen alteraciones genéticas en humanos que provocan la aparición o desaparición de uno o más dedos. Todos estos datos sugieren la existencia de un dispositivo genético capaz de controlar tanto el número como la identidad de los dedos (Bastida and Ros, 2008; McGlinn and Tabin, 2006; Tickle, 2006; Zeller, 2004).

La identidad de los dedos se puede definir como las características morfológicas que hacen de un dedo diferente al resto, en relación a la posición que ocupan dentro del autopodio. El tamaño del dígito, el número de falanges y la morfología de las mismas son las características utilizadas normalmente para diferenciar un dedo de los demás.

La extremidad de ratón, al igual que la humana, presenta un autopodio pentadáctilo formado por dedos que se enumeran del uno al cinco de anterior a posterior. En el pollo, el ala se compone de tres dedos, denominados 2, 3 y 4 y la pata, de cuatro cuya numeración es 1, 2, 3, 4, siempre empezado de anterior a posterior.

La primera evidencia de un centro de señalización capaz de controlar el eje antero-posterior fue, en 1968, cuando Saunders y Gasseling advirtieron que el trasplante de un fragmento de tejido mesenquimal posterior procedente de un primordio, a la región anterior de otro primordio, producía una duplicación en el número de dedos. Además observaron que el nuevo set de dígitos mostraba una simetría especular con respecto a los procedentes del espécimen receptor (Saunders JW, 1968). A este conjunto de células con actividad polarizante se le denominó zona de actividad polarizante o ZPA.

Por otro lado, en este tipo de ensayos se determinó que las células que formaban los nuevos dedos procedían del mesénquima del organismo receptor y no del donante, sugiriendo que la zona de actividad polarizante no constituía estos dígitos sino que instruía al mesénquima adyacente (Saunders JW, 1968). Este hecho se confirmó con los experimentos resumidos en la figura 17.

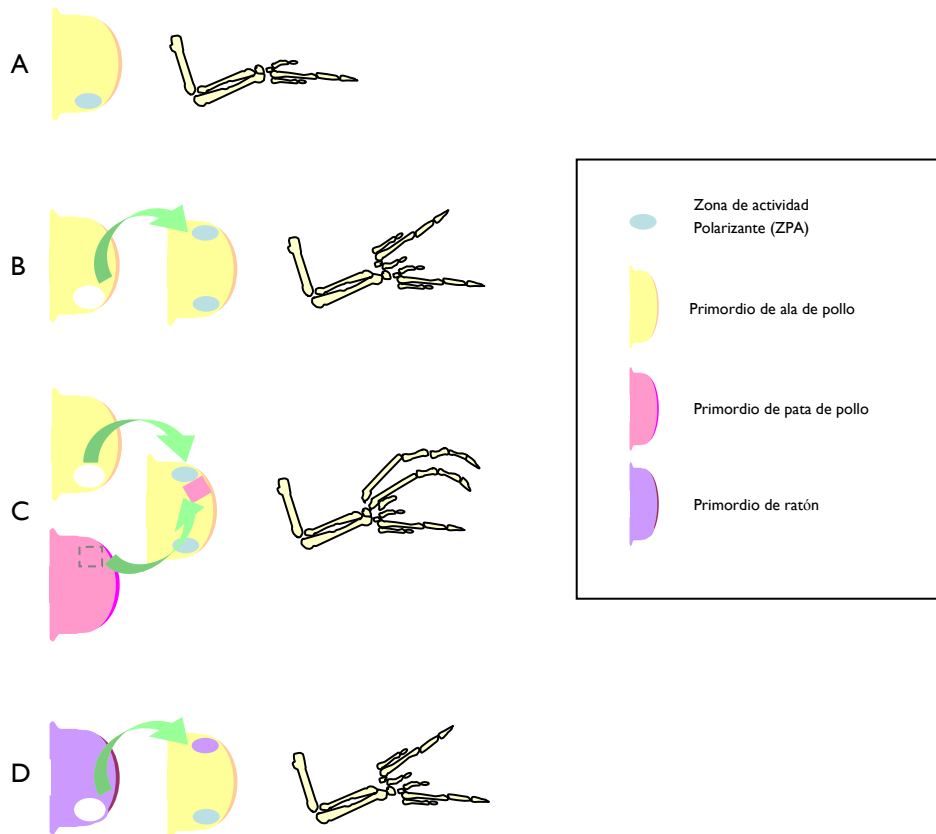
Resultados obtenidos en el embrión de pollo mediante trasplantes de ZPA bajo diversas condiciones apuntaron que las células que conformaban este centro de señalización podrían producir una señal morfogenética. Según esta hipótesis, esta señal difundiría desde la región posterior del primordio estableciendo un gradiente espacial con concentraciones crecientes de posterior a anterior. Las células del mesénquima encargadas de generar los dígitos, responderían de manera dependiente a la proximidad de la fuente, especificando la identidad de los dedos (Wolpert and Hornbruch, 1987).

Pasaron varios años hasta que se identificó una molécula candidata a ser la señal morfogenética endógena de la ZPA. La proteína SONIC HEDGEHOG (SHH) es una molécula difusible cuyo mRNA se localiza en las células de la zona de actividad polarizante del primordio de la extremidad de ratón y pollo (Riddle et al., 1993). La colocación en la parte anterior del primordio de grupos de células que sobreexpresan *Shh* o de microesferas impregnadas en esta proteína, provoca resultados similares al observado al transplantar regiones de ZPA (Riddle et al., 1993; Yang et al., 1997). Además el mutante de falta de función de *Shh* carece de todos los dígitos a excepción del dedo 1.

Posteriormente se estudió el papel de los factores de transcripción GLI, componentes determinantes en la vía de Hedgehog y efectores transcripcionales de la señalización por *Shh* (Hooper and Scott, 2005). Las proteínas GLI2 y GLI3, en ausencia de SHH, se encuentran en una variante procesada con actividad represora, impidiendo la transcripción de genes diana de esta vía de señalización. A la llegada de SHH, las proteínas GLI se mantienen en su estado nativo y son capaces de activar dichos genes, entre los que se encuentra *Gli1*. Mientras que los mutantes de falta de función de *Gli1* y *Gli2* no presentan fenotipo en la extremidad, el de *Gli3* presenta un número exagerado



de dígitos sin ningún tipo de patrón. La relación entre *Shh* y *Gli3* quedó evidenciada tras la generación del doble mutante *Shh*<sup>-/-</sup>/*Gli3*<sup>-/-</sup>, el cual exhibía un fenotipo idéntico al producido por la ausencia de únicamente *Gli3*. Se estableció que *Shh*, en la región posterior, regulaba el procesamiento proteolítico de GLI3, promoviendo su conformación transcripcionalmente activa, mientras que en la región anterior, GLI3 se mantenía como represor transcripcional. De esta manera, se producía un gradiente de la forma represora de GLI3, encargado de controlar el número de dedos así como principal responsable del correcto establecimiento del patrón antero-posterior (Fig. 18).



**Figura 17:** Resumen de los ensayos que demostraron la actividad polarizante de la ZPA, así como su papel instructivo en el mesénquima. A) Actividad de la ZPA en el primordio del embrión de pollo. B) El transplante de una ZPA a la región anterior de un primordio en desarrollo provoca una duplicación de los dígitos. C) En experimentos similares a los anteriores, la colocación de un mesénquima procedente de la pata en las inmediaciones de la ZPA transplantada produce una duplicación parcial que incluye dedos pertenecientes a la pata. D) El transplante de una ZPA de ratón a la parte anterior de un primordio de pollo produce duplicaciones en las que los dedos formados pertenecen al receptor.

Recientemente, estudios en los que se marcan genéticamente las células que han expresado en algún momento *Shh*, han demostrado la contribución de éstas a los dedos 3, 4 y 5 del primordio (Harfe et al., 2004). La aportación, por parte de las células de la ZPA, a la mayoría del autopodio ha probado que la región posterior de este

segmento del primordio se extiende en gran medida para formar la placa digital, posibilidad que ya sugirieron ensayos realizados en pollo (Vargesson et al., 1997). Por otro lado, el marcaje genético de las células que alguna vez han recibido señal de SHH sugiere que todos los dedos responden a esta señalización a excepción del dedo I que es independiente (Ahn and Joyner, 2004). Los resultados de estos grupos han provocado que en los últimos años se haya cuestionado el modelo de gradiente morfogenético aplicado a la ZPA y a su molécula SHH. Estos datos indican que existen dos mecanismos por los que *Shh* imprime la identidad de los dígitos, uno dependiente del gradiente de concentración, por el que queda especificado el dedo 2 y otro que incluiría el tiempo de exposición a SHH, el cual especificaría los tres dedos posteriores. Un dígito se especificaría como 5 al recibir, durante más tiempo, concentraciones elevadas de SHH; mientras que un dedo se especificaría como 3 al estar expuesto un menor tiempo (Fig. 18).



**Figura 18:** Modelos que tratan de explicar el mecanismo por el cual *Shh* controla el número e identidad de los dedos. (A) En el modelo morfogenético la concentración de SHH y de la forma represora de GLI3 controlan la identidad de los dedos. (B) En el modelo propuesto por Harfe en 2004 el dedo 2 se especificaría por gradiente de concentración de SHH y los dedos más posteriores por el tiempo de exposición a este factor. (C) Orden de aparición de los primordios digitales en el embrión de ratón. Resultados recientes (Zhu et al 2008 y Towers et al. 2008) han sugerido una función dual, perfectamente separable, en la que *Shh* especificaría la identidad de los dedos y, a continuación, incrementaría los precursores que los constituyen.

En este último año se ha propuesto un nuevo modelo basado en sorprendentes resultados obtenidos mediante la eliminación genética condicional de *Shh* en el

embrión de ratón (Zhu et al., 2008) y ensayos con ciclopamina, un inhibidor de la vía de Hedgehog, en el embrión de pollo (Towers et al., 2008). En estos recientes ensayos de pérdida de función en ratón, se eliminaba a diferentes tiempos *Shh* de la ZPA y se analizaba el orden de desaparición de los dedos. Éste resultó ser D3, D5, D2, D4 (el dedo I es independiente de la señalización por *Shh*) (Fig. 18). Dicha secuencia es impredecible desde cualquiera de los modelos previamente expuestos. Estos experimentos, complementados con una descripción de la aparición temprana de las condensaciones mesenquimales, con un examen de la identidad de los dedos y con un estudio de muerte/proliferación, dieron lugar a un modelo en el que *Shh* mostraba una función dual. Por un lado, en una fase muy temprana, *Shh* especificaría la identidad de los dígitos y posteriormente incrementaría el número de precursores mesenquimales que dan lugar a cada dedo. La similitud en las conclusiones obtenidas en los ensayos realizados en pollo, han validado este modelo de función dual para *Shh* (Towers et al., 2008).

## **2.6 Interacción entre los diferentes centros de señalización**

Aunque en los anteriores apartados hemos descrito los mecanismos de formación del eje próximo-distal, dorso-ventral y antero-posterior por separado, en realidad las vías de señalización encargadas del establecimiento de estos tres ejes en el primordio están interconectadas.

A continuación expondremos brevemente las interacciones existentes entre la ZPA y el resto de centros de organización y cómo estos se coordinan para generar una estructura compleja como es la extremidad de vertebrado (Fig. 19).

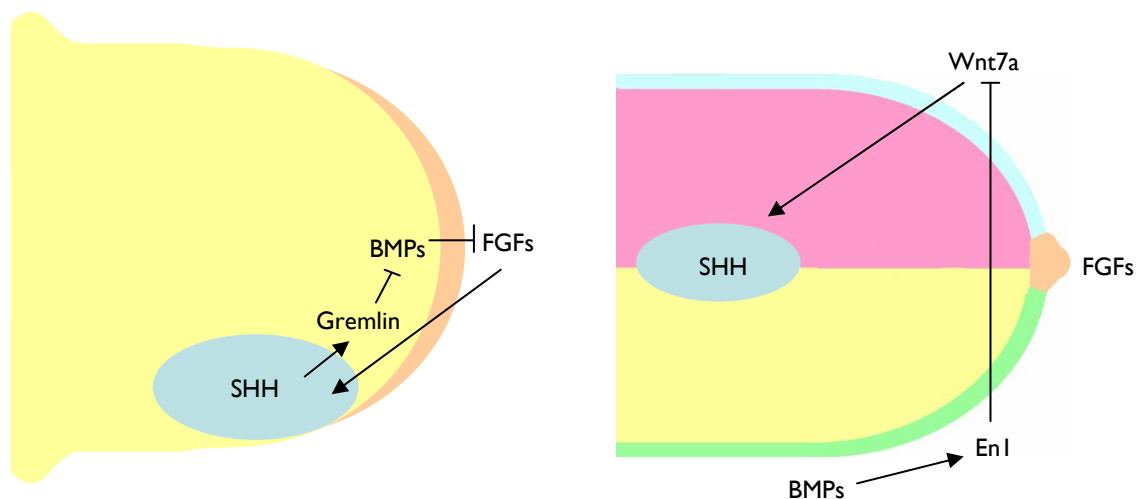
*Shh* se expresa en la ZPA momentos después de la inducción del AER así que, aunque parece claro que *Shh* no es requerido para este proceso, sabemos que existe una necesidad recíproca de una estructura respecto a la otra.

En embriones mutantes de falta de función de *Shh*, la expresión de los genes *Fgf4*, *Fgf9* y *Fgf17* normalmente localizada en la parte posterior del AER, se inicia de forma relativamente normal sin embargo, al poco tiempo, desaparece (Sun et al., 2000; Zuniga et al., 1999). Además, la activación ectópica de *Shh* en la parte anterior de un primordio en el embrión de pollo, provoca la extensión del AER en esa región, y una prolongación de *Fgf4* (Laufer et al., 1994; Niswander et al., 1994).

Por otro lado, la eliminación quirúrgica del AER produce una desaparición de la expresión de *Shh*, indicando un papel de esta estructura en el mantenimiento de la expresión de esta molécula. Sin embargo la ablación del AER y la posterior colocación de una microesfera impregnada en FGF4 permite el rescate de la expresión de *Shh* en la zona de actividad polarizante (Laufer et al., 1994; Niswander et al., 1994).

Estos experimentos indican un posible bucle de retroalimentación positiva entre *Fgf4* (también probablemente *Fgf9/Fgf17*) y *Shh* encargado de una correcta formación de la extremidad. Además este bucle parece incluir a *Gremlin*, un antagonista de BMPs, que sería activado por SHH en el mesénquima adyacente (Capdevila and Belmonte, 1999; Zuniga et al., 1999) y evitaría la acción negativa de las BMPs sobre *Fgf4* (Ganan et al., 1998; Pizette and Niswander, 1999), el cual mantendría la expresión de *Shh* en la ZPA. De esta manera, se consideró a *Gremlin* como el AEMF (factor de mantenimiento del

AER) propuesto por los experimentos clásicos. El fin de este bucle se produciría tras la expansión de las células de la región posterior, las cuales han expresado *Shh* y que son incapaces de activar *Gremlin*. A medida que estas células colonizan la mayor parte de la región distal del mesénquima, las BMPs dejan de ser reguladas por *Gremlin* e inhiben *Fgf4*, bloqueándose el mantenimiento de *Shh* y eliminando su expresión (Scherz et al., 2004). Este modelo ha sido ampliamente aceptado por la comunidad científica, sin embargo resultados recientes podrían incluir ciertas modificaciones. En primer lugar, el grupo de Sun ha propuesto un mecanismo alternativo que explicaría la finalización del bucle Fgf/Shh basado en variaciones en los niveles de FGFs producidos por el AER. En dicho modelo se postula que la secreción de altas cantidades de estos factores sería capaz de inhibir la expresión de *Gremlin* directamente, lo que provocaría la terminación del bucle (Verheyden and Sun, 2008). En segundo lugar, aunque la expresión de *Fgf8* parece no depender directamente de *Shh*, el triple mutante de falta de función de *Fgf4*, *Fgf9* y *Fgf17* no muestra diferencias en los niveles de *Shh* con respecto a los controles y las extremidades no tienen fenotipo alguno (Mariani et al., 2008). Tras analizar los niveles de *Fgf8* en el primordio de estos mutantes y descartar una posible compensación, todo parece indicar que la expresión de *Fgf8*, como único *Fgf* del AER, es suficiente para mantener *Shh* en la zona de actividad polarizante.



**Figura 19:** Interacciones moleculares que coordinan el eje antero-posterior con el eje próximo-distal y el eje dorso-ventral. La interconexión entre estas vías permite la generación de un correcto patrón y un adecuado crecimiento del primordio de la extremidad

No sólo el AER es capaz de interaccionar con la zona de actividad polarizante y modificar su actividad, si no que el ectodermo no-AER del primordio parece indispensable para su funcionamiento. En particular, la secreción por parte del ectodermo dorsal del factor WNT7a, podría jugar un papel imprescindible en la expresión de *Shh* (Parr and McMahon, 1995; Yang and Niswander, 1995). Tanto la eliminación del ectodermo dorsal en el embrión de pollo como el mutante de falta de función de *Wnt7a* presentan una severa reducción en el dominio de expresión de *Shh*.

## 2.7 La formación de los dedos: dígitos e interdígitos

A medida que el primordio se desarrolla, los diferentes elementos cartilaginosos se van conformando (Fig. 20). Estas estructuras en sus inicios se muestran como condensaciones de células mesenquimales que posteriormente se diferencian en cartilago (Wagner and Karsenty, 2001) y que finalmente se transforman en hueso mediante un mecanismo de osificación endocondral (Karsenty and Wagner, 2002; Kronenberg, 2003).



**Figura 20:** Tinción de elementos cartilaginosos en la pata del pollo a estadios progresivos mediante la utilización de Alcian blue que muestran la aparición secuencial de las diferentes falanges así como de las distintas articulaciones

Tras la condensación de los elementos más proximales del autopodio, carpos y metacarpos, se inicia la morfogénesis de los dedos, últimas estructuras cartilaginosas que se constituyen en la extremidad de vertebrado. La diferenciación condrogénica de los dígitos en tetrápodos (a excepción de anfibios) se inicia en aquellos situados más posteriormente para avanzar de manera secuencial hacia elementos más anteriores (Shubin, 1986); sin embargo recientemente se ha determinado que, al menos en ratón, las condensaciones mesenquimales se establecen en el siguiente orden d4, d2, d5, d3 y d1, difiriendo por completo en el patrón de diferenciación (Zhu et al., 2008).

El mecanismo por el cual una región del autopodio queda definida como dígito o interdígito no se conoce en detalle, no obstante sí sabemos que las diferencias iniciales entre ambas regiones engloban decisiones en el destino celular. Las células que van a dar lugar a dedos activarán un programa de condrogénesis que favorecerá la formación de los diferentes elementos esqueléticos, mientras que las células de los interdígitos emprenderán un programa apoptótico que finalizará con la desaparición de esta estructura.

En cuanto al dispositivo molecular encargado de la instauración y progreso de dichos programas, el factor de transcripción SOX9 y miembros de la superfamilia de los factores de crecimiento TGF $\beta$ s han sido identificados.

Sox9 es uno de los primeros marcadores moleculares asociados a las condensaciones y parece tener una labor imprescindible en las primeras etapas de su formación (Chimal-Monroy et al., 2003). Además, la sobreexpresión de esta molécula en el embrión de

pollo provoca la formación de elementos cartilaginosos ectópicos (Healy et al., 1999) y su haploinsuficiencia en ratón y humano provoca el síndrome de displasia campomélica asociado a alteraciones esqueléticas (Bi et al., 2001).

La superfamilia de los TGF $\beta$ s engloba varios subgrupos entre los que se encuentran la familia de los TGF $\beta$ s, las ACTIVINAS y BMPs. *Tgf $\beta$ 2* y *Tgf $\beta$ 3* se expresan en las condensaciones precondrogénicas en ratón y pollo respectivamente (Millan et al., 1991; Roark and Greer, 1994) y sus productos protéicos, junto con el de *Tgf $\beta$ 1* tienen capacidad condrogénica *in vitro* e *in vivo* (Hayamizu et al., 1991; Kulyk et al., 1989; Schofield and Wolpert, 1990). Además, la aplicación de microesferas impregnadas en TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 2 en los interdígitos del embrión de pollo provocan un descenso en los niveles apoptóticos y la aparición de estructuras cartilaginosas ectópicas (Ganan et al., 1996; Merino et al., 1998). En colaboración con los TGF $\beta$ s, la ACTIVINA $\beta$ a es una proteína dimérica que se expresa con intensidad en las condensaciones precondrogénicas y cuya aplicación ectópica en los interdígitos provoca la formación de estructuras cartilaginosas (Merino et al., 1999a). Al mismo tiempo, tratamientos en el primordio con FOLISTATINA, inhibidor de las activinas, inhibe la aparición de los dedos (Montero et al., 2008).

Las moléculas encargadas de promover la muerte celular programada en los interdígitos son las BMPs. Integrantes de esta familia como *Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp5* o *Bmp7* se expresan intensamente en los interdígitos y ensayos de sobreexpresión con estos factores promueven la apoptosis en este tejido (Ganan et al., 1996; Zou and Niswander, 1996; Zuzarte-Luis et al., 2004). Asimismo el bloqueo de esta vía mediante antagonistas como NOGGINA o GREMLIN inhibe la muerte celular en los interdígitos e impide la desaparición de estas estructuras, generando membranas. Este fenómeno provocado mediante diferentes manipulaciones se produce de forma natural en muchos vertebrados asociados al medio acuático. En el caso de la extremidad inferior del embrión de pato, la expresión de altos niveles de *Gremlin* bloqueando la actividad de las BMPs, permite la conservación de este tejido (Merino et al., 1999b).

La labor de los FGFs en la eliminación de los interdígitos ha sido motivo de debate en los últimos tiempos. La aplicación de microesferas con FGFs previene la muerte celular en los interdígitos durante las primeras etapas (Buckland et al., 1998; Ganan et al., 1996; Macias et al., 1996) pero una exposición continuada de estos factores, en colaboración con las BMPs, incrementa dramáticamente este proceso momentos después (Ganan et al., 1998; Montero et al., 2001). Estudios recientes, llevados a cabo en el mutante de falta de función en el AER del receptor BMPRIa, han sugerido un rol de los FGFs secretados por el AER en la supervivencia del tejido interdigital. El mecanismo propuesto apunta a una regulación negativa por parte de las BMPs de los interdígitos en la expresión de FGFs del AER. El descenso de los niveles de estos factores, encargados de la supervivencia de este tejido, permitiría la desaparición de las membranas interdigitales (Pajni-Underwood et al., 2007).

Curiosamente, las BMPs ejercen un papel destacado también en la formación de los dedos, promoviendo las condensaciones precondrogénicas y su diferenciación (Barna and Niswander, 2007; Pizette and Niswander, 2000). Existen indicios que señalan al receptor BMPRIb como la molécula responsable en la transmisión de la señal. Este receptor se expresa en el blastema digital y su mutante de falta de función presenta truncaciones en los dedos (Yi et al., 2000). Estos datos sugieren que la función dual en dígitos e interdígitos de las BMPs viene modulada diferencialmente por el receptor BMPRIa, que induce apoptosis interdigital y el receptor BMPRIb que promueve la

formación de los dedos. Sin embargo, actualmente no se han logrado diferenciar las BMPs expresadas en el primordio, que dirigen específicamente cada uno de los procesos.

## **2.8 Crecimiento de los dígitos: falanges y articulaciones**

Observaciones morfológicas han evidenciado que una vez que las condensaciones se establecen, éstas comienzan a crecer y simultáneamente y de manera periódica son segmentadas por las articulaciones determinando las distintas falanges (Francis-West et al., 1999b; Suzuki et al., 2008).

Recientemente se ha descrito una región, procedente del mesénquima subapical, localizada en la parte inmediatamente superior a cada primordio digital y con un programa molecular propio, encargada de generar cada una de las falanges de los distintos dedos. Este territorio se ha denominado *phalanx forming region (PFR)* /región formadora de falanges o *digit crescent (DC)* (Montero et al., 2008; Suzuki et al., 2008).

Por otro lado, la formación de una articulación se hace histológicamente patente con la generación de una interzona, una región de alta densidad celular en la que la condrogénesis se inhibe. Esta interzona deja de expresar marcadores característicos de cartilago y posteriormente sufre un proceso de cavitación, generando la cápsula y la cavidad articular.

No se conoce en detalle el mecanismo molecular por el cual se forman las articulaciones sin embargo existen numerosos genes que se expresan durante este proceso y que pueden usarse como marcadores. Existen tanto integrantes (*Bmp2* y *Gdf5*) como inhibidores (*Noggin* y *Cordin*) de la superfamilia de los TGFβs cuyo patrón de expresión bien se restringe a las articulaciones o bien las incluye (Archer et al., 2003; Brunet et al., 1998; Storm et al., 1994; Storm and Kingsley, 1996) (Fig. 21).

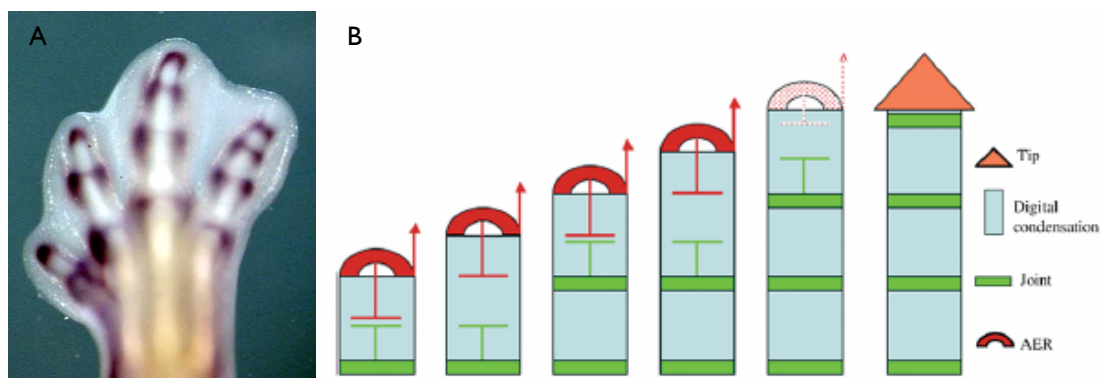
Aunque el mutante de falta de función de *Noggin* carece de articulaciones, de las moléculas citadas, *Gdf5* parece tener una mayor especificidad y relevancia en el proceso de formación de estas estructuras. Tanto la eliminación genética en el ratón como la ausencia de *Gdf5* en humanos provoca la desaparición o malformación de las articulaciones ((Polinkovsky et al., 1997; Storm and Kingsley, 1999). En cualquier caso, aunque se ha señalado la necesidad de *Gdf5* para la correcta constitución de las articulaciones, la sobreexpresión de este factor no provoca la inducción de una nueva articulación (Francis-West et al., 1999a; Storm and Kingsley, 1999). Esta capacidad inductiva reside en WNT14, factor secretado de la vía de Wnts, que se expresa en las articulaciones durante su establecimiento y cuya sobreexpresión, estimula la formación de articulaciones ectópicas (Hartmann and Tabin, 2001).

Recientemente en nuestro grupo se ha elaborado un modelo que explicaría el espaciamiento entre articulaciones basado en las siguientes observaciones:

- La inducción de una articulación, por medio de la sobreexpresión de *Wnt14* en regiones prospectivas, inhibe la generación de la articulación endógena. Este hecho sugiere un mecanismo auto-regulatorio.
- Las articulaciones no pueden formarse en la región más distal y datos preeliminares indican que microesferas impregnadas en FGF pueden inhibir la

creación de articulaciones. Esta evidencia podía indicar un dispositivo de regulación negativa producido por los FGFs secretados por el AER.

En este modelo, tras la constitución de una articulación, la condensación crecería y momentáneamente estaría incapacitada para formar una nueva articulación debido a la acción negativa en la región proximal de la articulación formada. A medida que la condensación se desarrolla esta inhibición se diluye con la distancia y una nueva articulación puede ser definida. Esto ocurriría periódicamente. Por su parte los FGFs del AER impedirían la formación de articulaciones en las regiones más distales y mantendrían, subapicalmente, un número suficiente de precursores de las regiones formadoras de falanges. Una vez que los FGFs se apagan, se forma la última articulación y se establece la punta (Fig. 21).



**Figura 21:** Formación de las articulaciones en el autopodio: A) Hibridación *in situ* mostrando la expresión de *Gdf5*, marcador de articulaciones, en una pata de embrión de pollo de estadio 34HH. B) Modelo de crecimiento de falanges y formación periódica de articulaciones: La formación de una nueva articulación estaría bloqueada por la articulación previamente establecida en la región proximal y por la cresta ectodérmica apical en la región distal. El crecimiento de la falange producido por el AER, permitiría el alejamiento de la capacidad inhibidora de esta estructura y la formación de una nueva articulación. Esto se produciría periódicamente hasta la desaparición de la cresta ectodérmica apical, momento en el cual se activa el programa de especificación de la punta (Casanova and Sanz-Ezquerro, 2007).

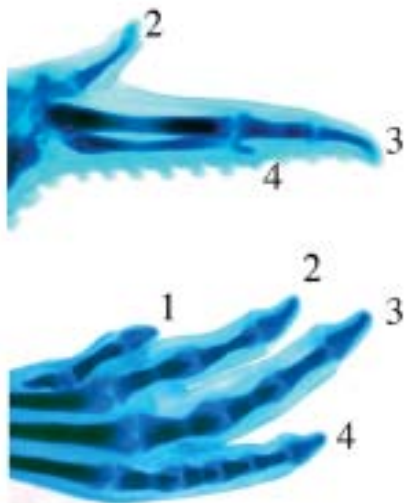
## 2.9 Plasticidad en la identidad de los dedos

Como ya hemos definido anteriormente la identidad de los dedos viene dada por una serie de características morfológicas diferenciales además de la posición asignada dentro del autopodio. Las diferencias que definen la identidad de un dígito son su longitud total, y el número y morfología de sus falanges.

Tanto las extremidades superiores como las inferiores del humano y el ratón presentan cinco dedos, que se numeran del I al 5, siendo el primero el más anterior y el quinto el más posterior. Estos dos dedos resultan fácilmente distinguibles el uno del otro sin embargo los dígitos intermedios (d2, d3 y d4) comparten un mayor número de similitudes. En ese aspecto el pollo resulta un modelo mucho más sencillo y abordable ya que tanto el ala, como la pata, muestran claras diferencias entre cada uno



de sus dedos. El ala del pollo presenta tres dedos numerados como 2, 3 y 4 y la pata cuatro numerados como 1, 2, 3 y 4 de anterior a posterior. Los dedos 2 y 3 del ala se componen de dos falanges mientras que el dedo 4 posee una. En la pata, los dígitos 1, 2, 3 y 4 muestran dos, tres, cuatro y cinco falanges respectivamente (Fig. 22)

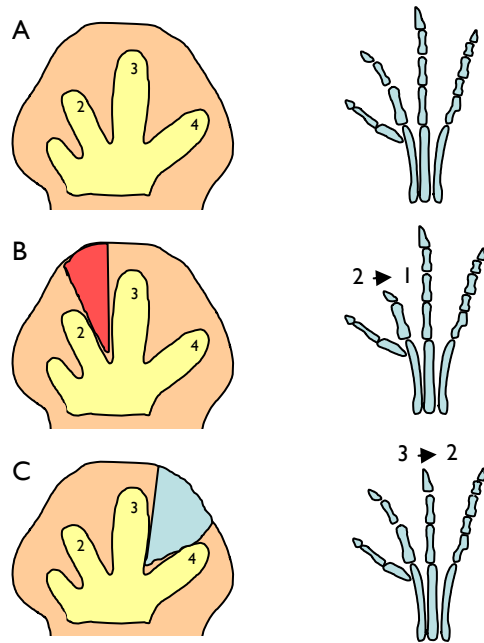


**Figura 22:** Tinción con Alcian green que muestra los elementos cartilaginosos en una pata y un ala de pollo de 36HH. El ala presenta tres dedos y la pata cuatro. En la extremidad inferior cada dígito exhibe un diferente número de falanges

Hemos descrito con anterioridad cómo *Shh*, desde la ZPA, controlaba el número y la identidad de los dedos. En etapas concretas, la zona de actividad polarizante asignaba un valor posicional a las células dentro del eje antero-posterior y éstas, posteriormente, durante la formación de los dedos, interpretaban su posición para asignar a cada dedo su identidad. En este proceso, el problema reside en saber cómo las células que han dejado de recibir señalización de la ZPA estadios atrás, interpretan esta información previa y la traducen en diferentes morfologías, en el momento de la generación de los dedos. Experimentos realizados en los últimos años, en los que se cambiaba la identidad de los dígitos en etapas tardías, han mostrado una sorprendente plasticidad de los primordios digitales (Dahn and Fallon, 2000; Sanz-Ezquerro and Tickle, 2000). Este fenómeno indicaría que la identidad de los dedos no se encuentra completamente fijada desde antes de la aparición de los primordios digitales, si no que durante su formación, existe una pequeña ventana de tiempo en que dicha identidad puede ser modificada.

En el laboratorio de Fallon se llevaron a cabo diferentes manipulaciones en extremidades de embriones de pollo a estadios tardíos que sugirieron que la identidad de los dedos viene especificada por el mesodermo de los interdígitos (Dahn and Fallon, 2000). Transplantes de interdígitos, bisecciones, transplantes de primordios de los dedos o colocación de barreras apuntaron que, los interdígitos más posteriores especifican identidades más posteriores y los primordios de los dedos adquieren su identidad de las señales procedentes de su interdígito más posterior (Fig. 23). De esta manera, el bloqueo de esta señal procedente del interdígito inmediatamente posterior, mediante su eliminación, o mediante la colocación de una barrera, provoca que el primordio del dedo adquiera una identidad más anterior. Además, estos mismos ensayos, así como estudios sucesivos, proponen que estas señales interdigitales corresponden a diferentes concentraciones de BMPs localizadas en este tejido y establecidas previamente por la acción de *Shh* (Dahn and Fallon, 2000; Suzuki et al., 2008). Sin embargo, aunque la colocación de microesferas impregnadas de NOGINA,

antagonista de BMPs, es capaz de provocar una reducción en el número de falanges, sugiriendo una identidad más anterior de los dedos manipulados, microesferas impregnadas en BMPs no tienen el efecto opuesto (Dahn and Fallon, 2000). Además el triple mutante de falta de función de *Bmp2*, *Bmp4* y *Bmp7* no tiene alteraciones en este sentido (Bandyopadhyay et al., 2006), lo cual cuestiona la validez de esta hipótesis, al menos en lo que al papel de las BMPs se refiere.



**Figura 23:** Esquema que sintetiza los experimentos realizados por Dahn y Fallon (Dahn and Fallon, 2000) en los que muestra la regulación de la identidad de los dedos mediada por los interdígitos. A) Primordio sin manipular. B) La eliminación del interdígito entre el primordio de dedo 2 y 3 provoca la transformación de este dígito en dedo 1. C) Asimismo la escisión del interdígito entre los dedos 3 y 4 produce la transformación del dedo 3 en 2.

En experimentos posteriores, el grupo de Ogura analizó el papel de *Tbx2* y *Tbx3* en la formación de la extremidad en el embrión de pollo y evidenció un posible rol de estas moléculas en la adquisición de identidad por parte de los dedos. TBX2 y TBX3 son factores de transcripción cuya expresión en la extremidad de pollo se restringe a los interdígitos más posteriores y cuya sobreexpresión es capaz de transferir identidad más posterior a los dedos anteriores. Además esta posteriorización, viene asociada a un incremento en los niveles de BMPs, sugiriendo que estos factores de transcripción podrían otorgar una identidad posterior a los dedos colocados en dicha posición, interaccionando conjuntamente con las BMPs (Suzuki et al., 2004). Estos datos se ven reforzados al haberse detectado mutaciones en el gen *Tbx3* en pacientes humanos con el síndrome ulnar-mamario, caracterizado por alteraciones o ausencia de los elementos esqueléticos posteriores.

Según el modelo propuesto, tanto los TBX como las BMPs expresados en el mesoderma interdigital, serían los encargados de interpretar y ejecutar las señales procedentes de la zona de actividad polarizante. La activación de estas moléculas en los interdígitos y la consecuente posteriorización de los dedos tras la colocación de microesferas impregnadas en SHH, apoyan dicho modelo. Sin embargo existen varias evidencias que podrían cuestionar su validez.

Microesferas con SHH en la región más posterior de la pata promueve la aparición de un dedo 4 con seis falanges, estructura no existente en la naturaleza. Del mismo modo, este mismo tipo de microesferas en el interdígito 2 del ala, no produce una

transformación del dedo 2 en dedo 3 como se esperaría si no que se genera un dedo 2 con una falange extra (Sanz-Ezquerro and Tickle, 2003).

En los experimentos llevados a cabo en el laboratorio de Fallon se consideró la variación en el número de falanges como única característica morfológica a la hora de calificar las modificaciones observadas, como cambios de identidad. Sin embargo este aumento o disminución en el número de falanges puede ser contemplado como un efecto indirecto debido a una prolongación en la vida del AER tal y como propuso el grupo de Tickle (Sanz-Ezquerro and Tickle, 2003). Dicho grupo evidenció que la colocación de microesferas de SHH en el interdígito, mantenía la expresión de *Fgf8* en el AER durante más tiempo. De esta forma postuló que esta expansión temporal de la cresta ectodérmica apical podría ser la responsable del aumento en el número de falanges tras la colocación de la microesfera de SHH. La confirmación se produjo tras la aplicación de microesferas con FGF8, las cuales provocaron elongación de los dedos o la colocación en un mismo interdígito de dos microesferas, una impregnada en SHH y otra en un inhibidor de la vía de FGFs, las cuales no produjeron cambios en el número de falanges.

Así pues el modelo formulado por este grupo planteaba la presencia de una señalización por *Indian Hedgehog (Ihh)* (homólogo de *Shh*) en los dedos formantes capaz de activar la vía de BMPs en el mesodermo de los interdígitos. Estas BMPs promoverían la actividad de un antagonista de la vía que bloquearía a las BMPs encargadas de la desaparición del AER y de esta manera, los FGFs provenientes de esta estructura promoverían el crecimiento del dedo. La desaparición del AER permitiría la formación de la última falange y la finalización del patrón del dígito. Lamentablemente, aunque este mecanismo explica muchos de los resultados descritos, actualmente no se han identificado algunos de los supuestos integrantes de dicho modelo. La búsqueda de estos componentes fue uno de los objetivos iniciales de esta tesis.

En este apartado se han mostrado diferentes experimentos en etapas tardías capaces de alterar el número de falanges especificado previamente para un dígito. Este mismo resultado puede ser interpretado tanto como un cambio en la identidad del dedo (Dahn and Fallon, 2000; Suzuki et al., 2004), como por una prolongación en el tiempo de crecimiento de éste (Sanz-Ezquerro and Tickle, 2003). En la actualidad, las carencias de ambos modelos suscitan la existencia de un debate en torno al análisis de estos resultados.

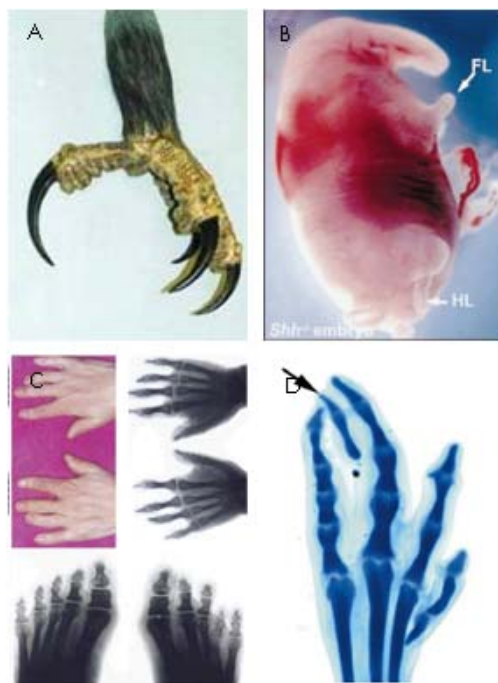
## **2.10 La punta: una falange diferente**

No resulta sorprendente imaginar que la formación de la punta es el último de los pasos en el establecimiento del patrón esquelético de la extremidad. Existen indicios que señalan que, en la extremidad inferior, la formación de la punta se produce tras la desaparición del AER, siguiendo una pauta antero-posterior y que la regresión de esta estructura condiciona su correcto establecimiento (Sanz-Ezquerro and Tickle, 2003). Esta última falange muestra ciertas características anatómicas, histológicas y moleculares que la diferencian del resto (Fig. 24).

Probablemente, la primera de estas características y que resulta más obvia es la presencia de unos apéndices ectodérmicos especializados que son las uñas o las garras. Así pues, la existencia de estos apéndices lleva asociada la formación de una compleja red micro-vascular que inevitablemente condiciona el patrón de irrigación de esta

falange. Tanto en ratón (Kaufmann, 1992) como en rata (Harman and A., 1938), gato (Frobisch, 2008) o seres humanos (Harman and A., 1938) se ha observado que pese a ser la última de las falanges en generarse, la punta se osifica previamente al resto. Además, en la cobaya, aunque la osificación de la puntas no se produce con anterioridad a la de las falanges más proximales, precede a las mediales (Harman and A., 1938). Este hecho refuerza el carácter especial de la última falange.

Otra propiedad intrínseca a esta falange es su capacidad de regeneración en vertebrados superiores (Borgens, 1982; Han et al., 2003; Han et al., 2008; Han et al., 2005; Muller et al., 1999). En anfibios urodelos se ha descrito una completa regeneración de la extremidad tras sufrir una amputación (Nye et al., 2003), sin embargo, en vertebrados superiores, la capacidad de regeneración en una extremidad amputada es muy limitada, produciéndose sólo si la mutilación es distal a la última falange. A día de hoy, el mecanismo molecular por el cual la punta de los dedos es capaz de regenerar no se conoce en detalle, no obstante tanto la vía de BMPs como uno de sus efectores, *Msx1*, parecen involucrados (Han et al., 2003).



**Figura 24:** La punta es un falange diferente. A) Presenta apéndices ectodérmicos especializados: uñas o garras; B) El mutante de *Shh* exhibe un único dedo que consiste en un elemento cartilaginoso sin articulaciones. Este dígito tiene una punta (Imagen modificada de Kraus 2001). C) En las braquidactilias humanas los dedos de los pacientes carecen de falanges mediales sin embargo muestran una punta (Imagen modificada de Gao 2001). D) En dígito inducidos ectópicamente puede evidenciarse una ausencia de falanges proximales o mediales, no obstante la punta se forma normalmente.

Existen numerosas evidencias que insinúan que la formación de la punta se produce tras la activación de un programa molecular propio distinto al del resto de las falanges. Se han descrito diferentes mutantes que aún careciendo de algunos elementos esqueléticos de la extremidad, incluyendo falanges, presentan una punta completamente formada. Es el caso, por ejemplo, del mutante de falta de función de *Shh*. Dicho ratón muestra un único dedo, un elemento cartilaginoso sin articulaciones que sorprendentemente exhibe una punta con uña incluida (Kraus et al., 2001). Además la existencia de enfermedades congénitas humanas, en particular braquidactilias, cuyos pacientes carecen de algunas falanges proximales o mediales pero presentan puntas, apoyan la existencia de un programa especial, independiente al implicado en la formación de las falanges proximales (Gao et al., 2001). Asimismo, dedos inducidos ectópicamente, mediante diferentes técnicas en el embrión de pollo,

pueden mostrar un mayor o menor número de falanges pero en la mayoría de los casos tienen punta. La naturaleza genética del programa encargado en la formación de la última falange permanece sin resolver, pero se ha descrito la existencia de genes que se expresan de manera diferencial en la punta y no en el resto de las falanges (Tabla 1).

<b>Tabla 1: Selección de genes con expresión específica en la punta (Casanova and Sanz-Ezquerro, 2007)</b>			
<b>Gen</b>	<b>Tipo de molécula</b>	<b>Función en la punta</b>	<b>Referencia/organismo</b>
Msx1	Factor de Transcripción	Regeneración de la punta a través de BMP4	(Han et al., 2003) Ratón
Msx2	Factor de Transcripción	Controla BMP4 pero no la respuesta regenerativa	(Han et al., 2003) Ratón
BMP4	Molécula señalizadora	Regeneración	(Han et al., 2003; Macias et al., 1997) Ratón
BMP7	Molécula señalizadora	Desconocida	(Macias et al., 1997) Pollo
TGFβ2	Molécula señalizadora	¿Condrogénesis?	(Merino et al., 1998) Pollo
ActivinβB	Molécula señalizadora	¿Condrogénesis?	(Merino et al., 1999a) Pollo
Wnt14	Molécula señalizadora	Desconocida	(Sanz-Ezquerro and Tickle, 2003) Pollo
BAMBI	Pseudoreceptor	Desconocida	(Grotewold and Ruther, 2002) Ratón
Netrin-1	Proteína secretada	Desconocida	(Engelkamp, 2002) Ratón
Unc5H2	Receptor	Desconocida	(Engelkamp, 2002) Ratón
Dlx5	Factor de Transcripción	Desconocida	(Acampora et al., 1999) Ratón
Dachshund	Factor de Transcripción	Desconocida	(Davis et al., 1999; Hammond et al., 1998) Ratón
MSal-3	Factor de Transcripción	Desconocida	(Ott et al., 2001) Ratón
Sall1	Factor de Transcripción	Desconocida	(Buck et al., 2001; Nishinakamura et al., 2001) Ratón
HoxC13	Factor de Transcripción	¿Desarrollo de la uña?	(Godwin and Capecchi, 1998) Ratón
R-Spo4	Proteína secretada	¿Inducción de la uña?	(Blaydon et al., 2006; Nam et al., 2007) Ratón y humano

En conjunto, todos estos indicios sugieren que la punta es una falange especial, con características morfológicas y anatómicas distintas y con un mecanismo de formación propio, diferente al del resto de las falanges.

## **2.11 Diferenciación de las condensaciones: Osificación endocondral**

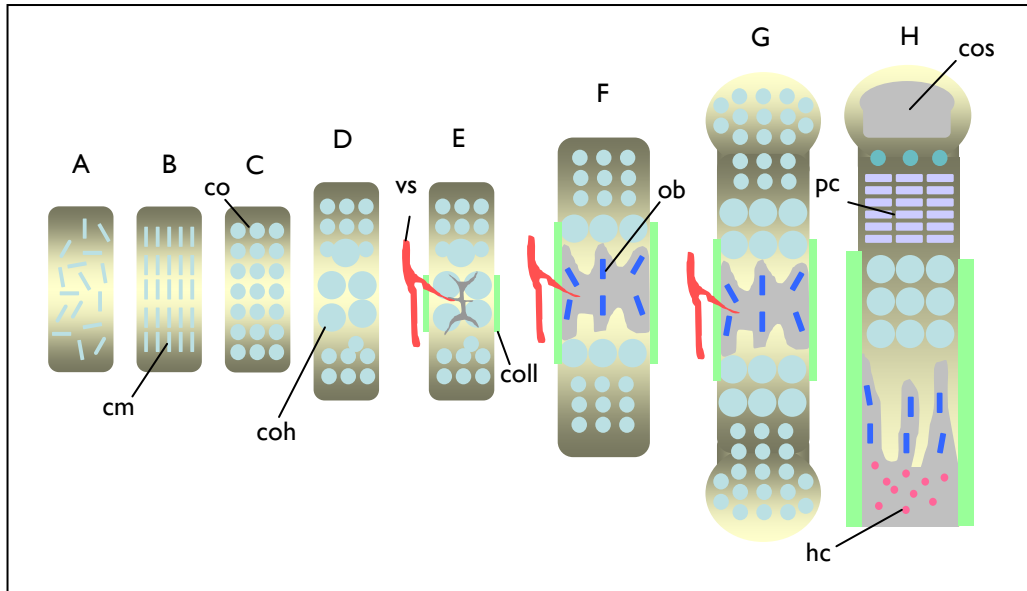
A medida que el patrón de condensaciones de la extremidad se establece, estos elementos comenzarán a sufrir un proceso de diferenciación en el cual se transformarán primero en cartílago y posteriormente a hueso. Esta diferenciación es un fenómeno gradual que sigue un patrón próximo-distal, iniciándose en los componentes más proximales y finalizando en los más distales. Como ya se ha indicado, esta dinámica no se mantiene en las falanges de muchos animales, especialmente mamíferos, donde la punta se osifica con anterioridad al resto (Frobisch, 2008; Harman and A., 1938; Kaufmann, 1992).

Las condensaciones mesenquimales no son más que grupos de células que comienzan a expresar una serie de moléculas de adhesión y se aglutinan. Existen ciertas condensaciones mesenquimales, por ejemplo las que forman el cráneo, que sufren la llamada osificación intramembranosa. En este tipo de osificación, las células mesenquimales se diferencian directamente a osteoblastos, secretando una matriz enriquecida en colágeno tipo I. Sin embargo, las condensaciones mesenquimales que constituyen la extremidad siguen la denominada osificación endocondral, caracterizada por mostrar, en primer lugar, un molde de cartílago y posteriormente hueso (Fig. 25). En este proceso, las células de las condensaciones mesenquimales se transforman en condrocitos, que exhiben una morfología especial y comienzan a producir una matriz rica en colágeno tipo II y proteoglicanos. Estas células expresan, entre otros factores, SOX9, y en las próximas etapas se encargarán de proliferar y secretar matriz para favorecer el crecimiento del cartílago. Las células que se sitúan en la periferia de la condensación mesenquimal pasan a formar parte del pericondrio. A continuación, los condrocitos localizados en la parte más interna del elemento cartilaginoso dejan de proliferar, adquieren una conformación alargada y comienzan a sintetizar colágeno tipo X, convirtiéndose en condrocitos hipertróficos. Este tipo celular es probablemente, el más determinante durante la osificación endocondral ya que va a llevar a cabo numerosas funciones.

- Dirigir la mineralización de la matriz cartilaginosa que las rodea.
- Atraer los vasos sanguíneos hasta el centro del elemento cartilaginoso.
- Atraer los condroclastos, células de naturaleza macrófaga, idénticas a los osteoclastos, capaces de digerir la matriz cartilaginosa.
- Promover la transformación de las células pericondriales en osteoblastos, células capaces de secretar matriz ósea y encargadas de generar los collares de osificación.

Tras completar sus numerosas funciones, los condrocitos hipertróficos mueren y su matriz secretada permite la entrada de los osteoblastos, localizados en la periferia, al

centro del elemento. Mientras que dichas células producen una matriz ósea y constituyen el centro de osificación primario, los condrocitos situados a cada lado y que aún no se han diferenciado, continúan dividiéndose y fomentan el crecimiento del elemento. La región de hueso osificada a partir de un centro de osificación primario se le conoce como diáfisis, y a la interfase entre los condrocitos proliferantes y la diáfisis se le denomina placa de crecimiento.



**Figura 25:** La Osificación endocondral. (B) Condensación de las células mesenquimales. (C) Transformación de las células mesenquimales en condrocitos. (D) Los condrocitos situados en el centro de la condensación dejan de proliferar y se vuelven hipertróficos. (E) Los condrocitos hipertróficos sufren un proceso de apoptosis. Al mismo tiempo, las células pericondriales adyacentes a estos condrocitos hipertróficos pasan a ser osteoblastos generando el collar de osificación. Se produce la invasión de vasos sanguíneos y comienza la mineralización. (F y G) Los osteoblastos invaden la zona central del elemento. Los condrocitos de los extremos mantienen su capacidad proliferativa permitiendo el crecimiento del elemento. (H) Centros de osificación primario, secundario y placa de crecimiento en un hueso en formación. Cm: Célula mesenquimal. Co: Condrocito. Coh: Condrocitos hipertróficos. Vs: Vasos sanguíneos. Coll: Collar óseo. Ob: Osteoblasto. Cos: Centro de osificación secundario. Pc: Placa de crecimiento. Hc: Célula Hematopoyética.

Asociados a los huesos largos y a medida que estos elementos esqueléticos van creciendo, se forman unos centros secundarios de osificación. Estos nuevos centros de osificación se sitúan cercanos a las placas de crecimiento quedando estas últimas flanqueadas por el centro de osificación original y los secundarios. La parte del hueso que se osifica mediante un centro de osificación secundario se le denomina epífisis. Los elementos esqueléticos del estilopodio (fémur, húmero) y zeugopodio (radio, ulna y tibia, fibula) al igual que las falanges, se consideran huesos largos. Por consiguiente, se componen de centros de osificación primarios y secundarios, sin embargo estos últimos, en su mayoría no se generan durante la embriogénesis si no que se desarrollan en etapas postnatales.

### **3. Estudio de nuevos genes en la extremidad de vertebrado**

En los apartados anteriores se ha intentado resumir los aspectos fundamentales del desarrollo de la extremidad en vertebrado, desde sus inicios hasta la diferenciación de sus elementos esqueléticos. El interés de nuestro laboratorio en este proceso es completo y engloba todas y cada una de las etapas descritas. Por este motivo, durante la realización de esta tesis doctoral se ha intentado mantener una visión general del desarrollo de la extremidad y el estudio llevado a cabo abarca etapas separadas en el tiempo pero íntimamente relacionadas. En un primer proyecto hemos analizado la expresión y función de un gen, *Arid3b*, durante la formación de la cresta ectodérmica apical mientras que paralelamente hemos ahondado en las peculiaridades asociadas a la última falange y su establecimiento.

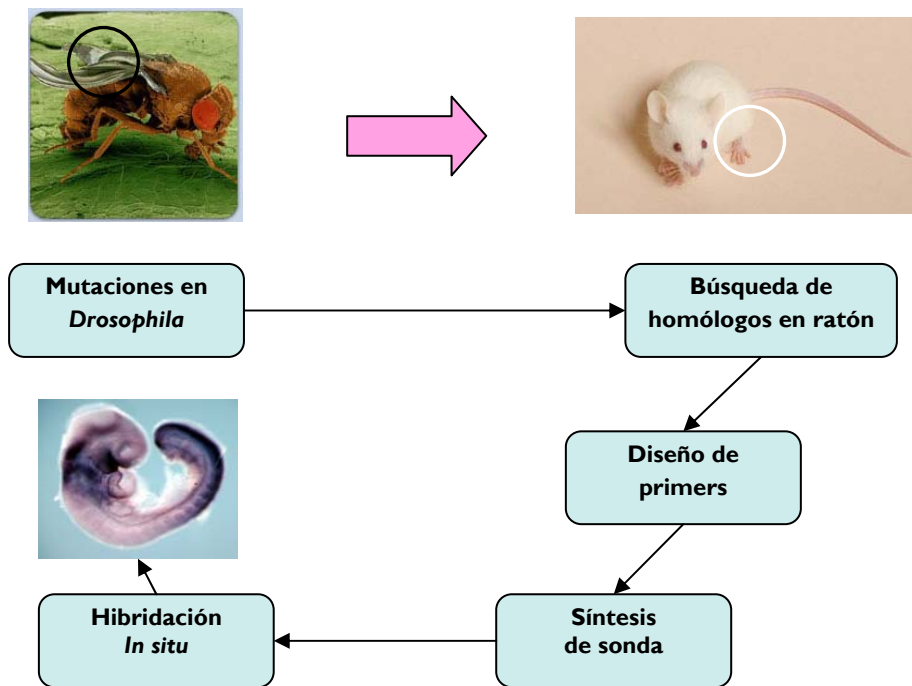
#### **3.1. El proyecto de genómica comparada: Abordaje de genes candidatos**

El proyecto de genómica comparada, desarrollado en el laboratorio de Miguel Torres, surgió con el objetivo de descubrir nuevos genes implicados en la formación de patrón en la extremidad de vertebrado y comprendía diferentes abordajes. En la primera tentativa se llevó a cabo un análisis de expresión diferencial mediante *microarrays* en el que se comparaban las zonas de progreso de primordios de ratón a diferentes estadios. En el segundo abordaje, se desarrolló un *screening* de expresión, por hibridación *in situ* en embriones de ratón, basándonos en secuencias de vertebrados homólogas a mutantes de *Drosophila melanogaster* que mostraban fenotipo en ala. En esta acometida, realizada en colaboración con el grupo de Ginés Morata y José Félix de Célis en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO) se identificaron los homólogos en ratón de los genes causantes de dichos fenotipos en mosca y se diseñaron oligos, para mediante PCR, sintetizar una sonda de RNA contra estos genes candidatos. Una vez obtenida la sonda se realizaron hibridaciones *in situ* en embriones de ratón de diferentes estadios embrionarios y si el patrón en la extremidad resultaba sugerente se analizaba dicho gen en detalle (Fig. 26).

La hipótesis de trabajo consistía en que si un gen se encontraba implicado en la formación del ala de *Drosophila*, podría ocurrir que su homólogo en ratón resultase también imprescindible en el correcto desarrollo de la extremidad en vertebrado.

De los aproximadamente 50 genes estudiados, *Arid3b* (*Dril2/Bdp*), uno de los homólogos del gen de *Drosophila* *Dead ringer/Retained* (*Dri/Retn*) en vertebrados, mostraba un patrón de expresión que incluía la cresta ectodérmica apical a lo largo de distintas etapas de desarrollo. Además otro gen de interés resultante de este análisis fue *Sp8*, homólogo de *Buttonhead*, cuyo papel en la función del AER fue demostrado poco después (Bell et al., 2003; Kawakami et al., 2004; Treichel et al., 2003).





**Figura 26:** Esquema del proyecto de Genómica comparada. Numerosos genes implicados en la formación del ala de *Drosophila* presentan un homólogo funcional durante el desarrollo de la extremidad de vertebrado (Morata, 2001).

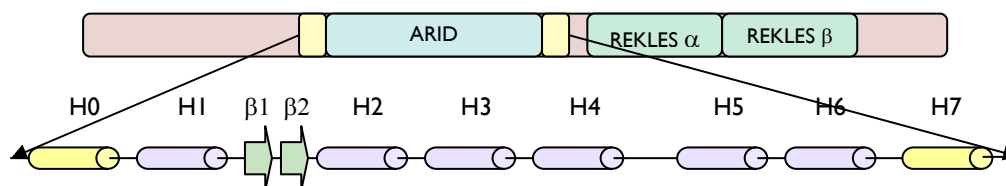
### **3.1.1. Dead ringer y ARID3b son miembros de la familia ARID de factores de transcripción**

Tanto *Dead ringer* como *Arid3b* pertenecen a la familia ARID de factores de transcripción. Dicha familia ha sido implicada en numerosos procesos biológicos como son crecimiento y diferenciación celular, control del ciclo celular o desarrollo embrionario (Kortschak et al., 2000; Wilsker et al., 2002).

Los miembros de dicha familia se caracterizan por poseer un dominio ARID (AT-rich interaction domain) de unión a DNA, una secuencia de unos 80-100 aminoácidos que codifica para un motivo hélice-giro-hélice compuesto por 6  $\alpha$ -hélices (H1-H6) y que muestra cierta tendencia a unirse a secuencias ricas en AT (Gregory et al., 1996; Iwahara and Clubb, 1999; Iwahara et al., 2002; Patsialou et al., 2005) (Fig. 27). Según mostró la estructura cristalográfica de este dominio, el surco mayor de unión a DNA se encuentra formado por la hélice 4, el bucle 2 y la hélice 5 (Iwahara and Clubb, 1999; Iwahara et al., 2002) y ensayos con formas mutantes evidenciaron que resulta imprescindible para el correcto reconocimiento y posterior unión al DNA (Patsialou et al., 2005; Shandala et al., 2002). El dominio ARID se encuentra muy conservado a lo largo de la evolución en la mayoría de estos factores de transcripción.

Algunos integrantes de esta familia se caracterizan por poseer a cada lado del dominio ARID una secuencia conservada de unos 40 aminoácidos (H0 y H7), que parece implicada en mantener la especificidad del reconocimiento DNA-proteína (Kortschak et al., 1998) y que codifica para una  $\alpha$ -hélice. El dominio ARID junto con estas secuencias flanqueantes se denomina dominio ARID extendido y da nombre a una

subfamilia dentro de estos factores de transcripción. Dicha subfamilia, ARID-extendida (eARID), a la que pertenecen *Dead ringer* y *Arid3b*, resulta específica de Metazoos y surgió tras su divergencia del reino Fungi.



**Figura 27:** Representación esquemática que muestra los dominios de la proteína Arid3b/Dril2/Bdp. Estos dominios se mantienen en su homólogo en *Drosophila*, *Dead ringer*/Retained.

También particular de la subfamilia eARID es la presencia de dos dominios, cercanos a la región C-terminal de la proteína, denominados RECKLES $\alpha$  y RECKLES $\beta$ , este último muy conservado. El primero permite la entrada al núcleo a este factor de transcripción y el segundo su salida (Kim and Tucker, 2006). Recientemente, se ha descrito la implicación del dominio RECKLES $\beta$  en la generación de complejos multiméricos de estos factores tanto consigo mismo como con otras moléculas, así como su interacción con la matriz nuclear (Kim et al., 2007). No obstante, el papel de este dominio en la formación de complejos homoméricos es motivo de controversia (Shandala et al., 2002).

### 3.1.2. **Dead ringer/Retained en el desarrollo de *Drosophila*:**

*Dead ringer/Retained* (*Dril/Retn*) puede ser detectado desde las primeras horas en el desarrollo de la mosca ya que existe una distribución ubicua tanto del RNA mensajero como de la proteína de origen materno. Posteriormente el embrión comienza a expresar *Dead ringer* específicamente en el mesodermo durante la extensión de la banda germinal para, a continuación, en la embriogénesis, detectarse en los músculos faríngeos, glándulas salivares, en diferentes localizaciones a lo largo del tubo digestivo o en puntos concretos dentro del sistema nervioso central. En tejidos extraembrionarios, aparece en la amnioserosa, membrana encargada de cerrar la banda germinal en posición dorsal (Gregory et al., 1996).

Se han generado mutantes para *Dead ringer* con diferentes grados de afectación. Los mutantes hipomorfos que presentan un fenotipo más leve, alcanzan la edad adulta pero, en el caso de las hembras, exhiben trastornos relacionados con la sexualidad. Estas mutaciones puntuales ocasionan trastornos de comportamiento en el proceso de apareamiento o cortejo así como en la deposición de los huevos (Ditch et al., 2005; Schupbach and Wieschaus, 1991). El resto de los mutantes hipomorfos, además de los mutantes totales, muestran letalidad embrionaria (Shandala et al., 1999). Los primeros, únicamente sufren alteraciones en el tubo digestivo (Shandala et al., 1999) y en el posicionamiento de las células gliales en el sistema nervioso (Shandala 2003), mientras que los segundos también presentan anomalías en el desarrollo del músculo somático (Shandala et al., 1999). El caso más extremo se produce al eliminar tanto la expresión de *Dead ringer* en el embrión como el componente materno. En estos embriones, procesos esenciales como la segmentación embrionaria, la retracción de la banda

germinal, o la formación de un correcto patrón en el eje antero-posterior (especialmente evidente en las regiones terminales) se ven completamente alterados. Asimismo, se han observado variaciones en los niveles de expresión de *Wingless* y *Engrailed* durante la formación de los segmentos y de *Argos* y *Buttonhead* en las estructuras terminales del eje antero-posterior. Además dichos especímenes carecen de un correcto desarrollo del músculo somático, del esqueleto céfalo-faríngeo y de las células pericárdicas (Shandala et al., 1999).

Previamente se determinó que *Dead ringer* podría estar implicado también en la generación de un adecuado patrón dorso-ventral (Hader et al., 2000; Valentine et al., 1998), permitiendo la transformación del activador transcripcional DORSAL (DL) en un represor. *Dead ringer* y *Dorsal*, conjuntamente, restringirían la expresión de *Zerknullt* (*Zen*) a la región dorsal del embrión y evitarían la expansión de *Huckebein* (*Hkb*) del borde anterior y posterior a la totalidad del surco ventral.

Durante el desarrollo larvario, *Dead ringer* mantiene su patrón de expresión en la mayoría de los tejidos antes citados, sin embargo se detectaron altos niveles de esta molécula en numerosas regiones en el disco imaginal de ala, especialmente en los precursores de las sensilas campaniformes (Shandala et al., 2002). Asimismo, la sobreexpresión de una forma dominante negativa de *Dead ringer* en el disco imaginal de ala, genera un apéndice con borde irregular, con alteraciones en venas y pérdida de sensilas campaniformes (Shandala et al., 2002).

### 3.1.3. Arid3b/Bdp

Originalmente, *Arid3b* se aisló procedente de una librería de cDNAs de testículo humano (Numata et al., 1999) y ensayos por *Northern blot* determinaron expresión de dicho gen en numerosos tejidos adultos en esta especie (Numata et al., 1999) (Tabla 2).

Estudios en el campo de la oncología han demostrado la implicación de dicho gen en tumorigénesis. En primer lugar se han observado altos niveles de *Arid3b* en líneas celulares de diferentes tipos tumorales como leucemias eritrocíticas o neuroblastomas malignos (Kobayashi et al., 2006; Numata et al., 1999). Además, mientras que el uso de oligonucleótidos antisentido y RNA interferente contra este factor de transcripción reduce significativamente el crecimiento de neuroblastomas *in vitro*, su sobreexpresión en este tipo de líneas celulares aumenta la malignidad de dicho tumor en ensayos con ratón (Kobayashi et al., 2006).

Posteriormente al comienzo de esta tesis doctoral, tanto el patrón de expresión como el papel de *Arid3b* en embriogénesis murina fue publicado (Takebe et al., 2006).

Según este artículo este factor de transcripción se expresaría principalmente en estructuras tales como arcos branquiales, cresta neural, rombómeros, tracto de salida del corazón y vesícula ótica a diferentes estadios. En la región caudal detectaron altos niveles de *Arid3b* en el tubo neural y en el mesodermo así como en los somitos nacientes. El mutante de falta de función de este factor de transcripción resultaba letal embrionario a estadios E11.5-12.5 y mostraba retardo en el crecimiento, alteraciones en el cierre del tubo neural, defectos cardiovasculares, y estructuras craneofaciales anómalas, estas últimas producidas por un defecto en la supervivencia de las células del mesénquima craneal. La penetrancia del fenotipo contemplado resultó variable.

<p><b>Tabla 2:</b> <b>Arid3b en tejidos adultos</b></p>	
<b>TEJIDO</b>	<b>NIVELES</b>
Músculo esquelético	Bajo
Pulmones	Bajo
Riñón	Bajo
Corazón	Bajo
Intestino	Bajo
Páncreas	Bajo
Bazo	Bajo
Timo	Bajo
Próstata	Bajo
Leucocitos	Alto
Testículos	Alto

Aparte de *Arid3b*, otro de los homólogos en vertebrados del gen *Dead Ringer/Retained* que más se ha estudiado es *Arid3a/Bright*, regulador de la transcripción de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (Herrscher et al., 1995; Webb et al., 1989; Webb et al., 1991). *Arid3a* se expresa ubicuamente en el embrión de ratón y específicamente en los linfocitos B del individuo adulto, tanto en ratón, como en humano (Kortschak et al., 1998; Nixon et al., 2004; Webb et al., 1998). Además este gen resulta esencial para la gastrulación en el embrión de *Xenopus laevis* (Callery et al., 2005).

En esta tesis doctoral llevaremos a cabo un estudio pormenorizado del patrón de expresión de *Arid3b* en el embrión de pollo y ratón así como el clonaje del homólogo de este gen en pollo. A continuación analizaremos el papel de *Arid3b* durante el desarrollo embrionario, especialmente durante la formación de la extremidad.

### **3.2. Estudios en la formación de la punta de los dedos**

Tal y como hemos justificado anteriormente, la punta de los dedos parece poseer ciertas peculiaridades que la hacen ser especial frente al resto de las falanges. Evidencias morfológicas, anatómicas, histológicas y genéticas apoyan dicha hipótesis y sugieren un programa molecular propio durante su formación. Aunque actualmente se conocen un buen número de genes que se expresan específicamente en la última falange, en nuestro esfuerzo por desentrañar dicho programa molecular hemos analizado el patrón de expresión de *Bambi* y *Sp8*.

#### **a. Bambi**

BAMBI (BMP and activin membrane-bound inhibitor) es un antagonista de BMPs que actúa como pseudoreceptor (Onichtchouk et al., 1999). Se trata de una proteína transmembrana relacionada con los receptores tipo I de la familia TGF $\beta$  que es capaz de unirse a su ligando (BMPs) pero carece de dominio intracelular con actividad kinasa, por lo que resulta incompetente a la hora de transducir la señal mediada por este ligando. En cuanto a su regulación, tanto la señalización por BMPs como por Wnts parecen implicadas en dicho proceso en los distintos sistemas estudiados (Onichtchouk et al., 1999; Sekiya et al., 2004; Tsang et al., 2000).

Durante el desarrollo embrionario, *Bambi* ha sido detectado en diferentes estructuras de especies tales como xenopus, pez cebra, ratón y recientemente en pollo siendo observado en patrones solapantes a los descritos para BMPs (Grotewold et al., 2001; Onichtchouk et al., 1999; Tsang et al., 2000; Zuzarte-Luis et al., 2004). Mediante técnicas de hibridación *in situ*, tanto en el embrión de pez cebra, como en el de ratón, se ha mostrado expresión de *Bambi* en la cresta ectodérmica apical durante el desarrollo temprano de la extremidad (Grotewold et al., 2001; Tsang et al., 2000). A estadios posteriores la expresión de este pseudoreceptor en la extremidad de ratón se extiende al mesénquima subyacente al AER, para posteriormente, ocupar también el mesodermo de los interdígitos. Curiosamente, en las etapas más tardías, *Bambi* se expresa en la punta de los dedos (Grotewold et al., 2001).

En el embrión de pollo, únicamente se ha descrito la presencia de *Bambi* en los interdígitos, utilizándose como marcador de dicha región (Zuzarte-Luis et al., 2004).

#### **b. Sp8**

Como ya hemos mostrado anteriormente, SP8 es un factor de transcripción de la familia de los dedos de zinc, que se expresa en la cresta ectodérmica apical durante la formación de la extremidad en el embrión de ratón, pollo y pez cebra. Además, ensayos de ganancia y pérdida de función en los citados modelos, han certificado un papel imprescindible de este gen en la formación del AER (Bell et al., 2003; Kawakami et al., 2004; Treichel et al., 2003). Aunque actualmente se conoce tanto su patrón de expresión como su función en el desarrollo temprano de la extremidad, nada se sabe sobre una posible actividad en etapas posteriores.

Tras un estudio del patrón de expresión en etapas avanzadas, hemos comprobado que *Sp8* y *Bambi* se expresan en la punta de los dedos tanto del embrión de pollo como de ratón. Esta observación podría apuntar a un posible papel de ambos genes durante la formación de la última falange.

Por otro lado, hemos estudiado en detalle el patrón de osificación de la pata y el ala del embrión de pollo, ahondando en las posibles diferencias entre la punta y las falanges proximales y mediales.

Para complementar dicho estudios, similares experimentos se han realizado en el embrión de pato. Esta especie muestra ciertas diferencias anatómicas con respecto al pollo, entre las que destacan la presencia de garra en el dedo 3 del ala.

Por último, utilizaremos el patrón de expresión del gen *Bambi* en el ala del embrión de pollo como herramienta para determinar cambios en la identidad de los dedos en etapas tardías.





## OBJETIVOS





# **OBJETIVOS**

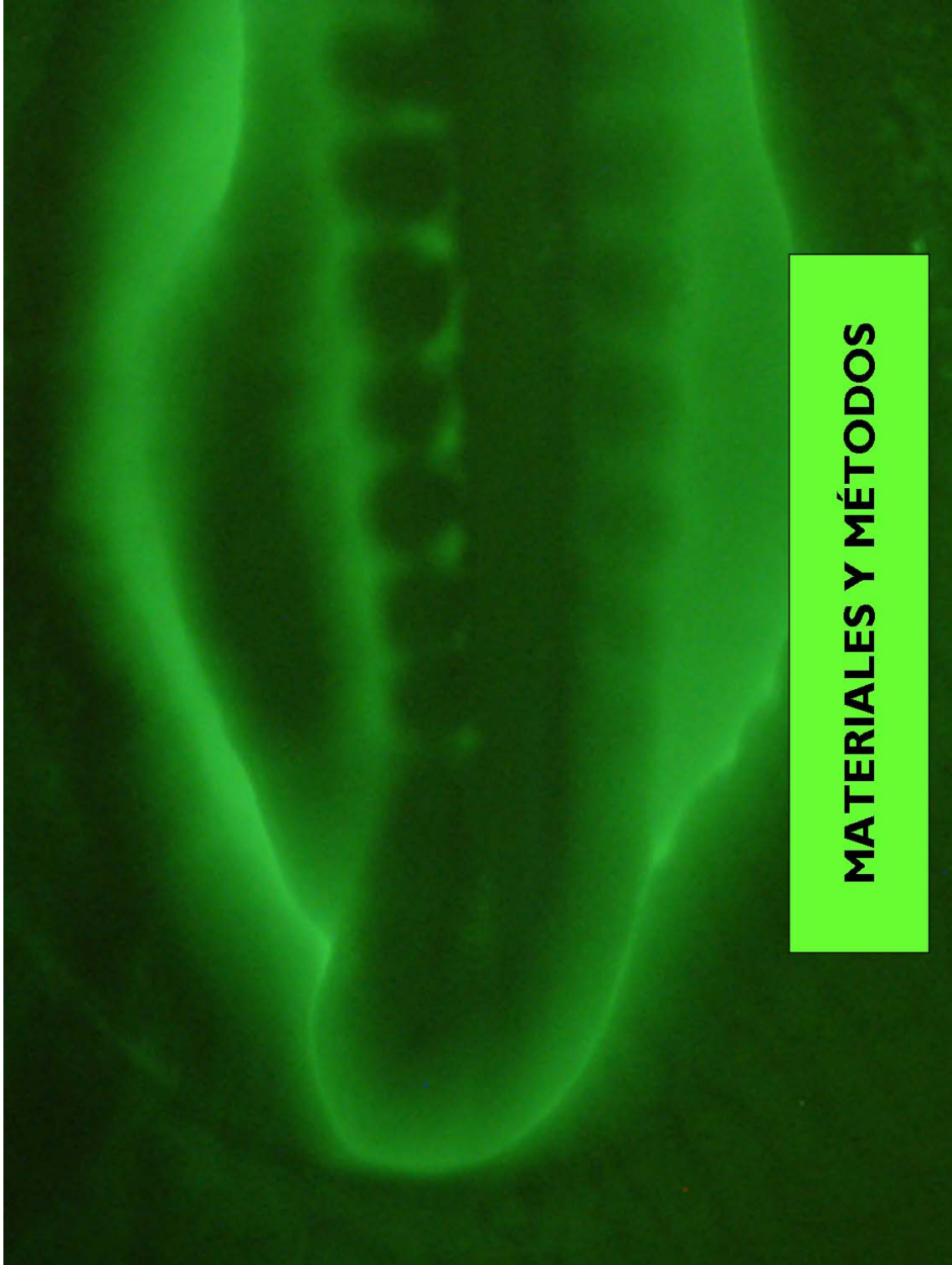
## **Objetivo General:**

Aportación de nuevos datos al estudio del desarrollo de la extremidad de vertebrado, tanto en etapas tempranas durante la formación del primordio, como en etapas tardías en el momento de establecimiento de la punta de los dedos.

## **Objetivos Específicos:**

1. Búsqueda de nuevos genes implicados en la formación y desarrollo del primordio de la extremidad de vertebrados.
  - a. Descripción del patrón de expresión de *Arid3b* en el embrión de ratón y pollo, especialmente en el primordio de la extremidad en formación.
  - b. Análisis funcional de *Arid3b* durante el desarrollo de la extremidad. Esto incluye ensayos de ganancia y pérdida de función en el embrión de pollo así como la generación de un modelo de falta de función (*Knock-out*) en ratón.
2. Estudio del proceso de formación de la punta de los dedos durante su establecimiento.
  - a. Análisis del patrón de osificación en las falanges de las extremidades del embrión de pollo y pato. Estudio comparativo de la dinámica de osificación entre falanges proximales-mediales y puntas.
  - b. Descripción del patrón de expresión de *Sp8* y *Bambi* en la punta de los dedos del embrión de pollo y pato.







# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## **I. Materiales:**

### **Reactivos, enzimas y kits:**

- 100bp DNA Ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
- Absolutely RNA miniprep kit (Stratagene La Jolla, CA, USA)
- Ácido clorhídrico (Merck, Darmstadt, Germany)
- Ácido Maléico (Sigma-Aldrich Corp; St. Louis, MO, USA)
- Ácido tricloroacético (Merck, Darmstadt, Germany)
- Agarosa (Bio- Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
- Alcian Blue (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO)
- Alcian green (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO)
- Alizarin red (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO)
- Ampicilina (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO, USA)
- Aquatex mounting media (Sigma-Aldrich Corp; St. Louis, MO)
- Blocking Reagent (Roche, Mannheim, Germany)
- BM purple (Roche, Mannheim, Germany)
- Bromuro de etidio (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO, USA)
- Chaps (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO, USA)
- Cloruro de magnesio (Merck, Darmstadt, Germany)
- Cloruro de sodio (Merck, Darmstadt, Germany)
- DTT (Invitrogen Corp; Carlsbad, CA, USA)
- DNAsa (Roche, Mannheim, Germany)
- EDTA (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO, USA)
- Enzimas de restricción (Roche, Mannheim, Germany y New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
- Etanol (Merck, Darmstadt, Germany)
- Eukitt (Panreac Química, Barcelona, España)
- Expand High Fidelity PCR system (Roche, Mannheim, Germany)
- Expand Long Template PCR system (Roche, Mannheim, Germany)
- Extracto de levadura (Gibco BRL Life-Technologies GmbH, Eggenstein, Germany)
- Fast green FCF (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO, USA)
- Fenol/Cloroformo (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO, USA)
- Ferrocianato potásico (Merck, Darmstadt, Germany)
- Ferrocianuro potásico (Merck, Darmstadt, Germany)
- Formamida (Panreac Química, Barcelona, España)
- Glicerol (Merck, Darmstadt, Germany)
- Glutaraldehído (Sigma-Aldrich Corp; St. Louis, MO)
- Gold Taq polymerase (Applied Biosystems; Foster City, CA)
- Heparina (Sigma-Aldrich Corp; St. Louis, MO)
- Hidróxido de potasio (Merck, Darmstadt, Germany)

- Hidróxido de sodio (Merck, Darmstadt, Germany)
- Isopropanol (Merck, Darmstadt, Germany)
- Lambda DNA-BstE II Digest (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
- Levamisol (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO)
- Master Mix Taq polymerase (Eppendorf, Hamburg, Germany)
- Metanol (Merck, Darmstadt, Germany)
- Metil salicilato (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO, USA)
- Microesferas AGI-X2 de 150-200 µm de diámetro (Bio- Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
- Microesferas acrílicas recubiertas de heparina (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO, USA)
- Paraformaldehído (Merck; Darmstadt, Germany)
- PCR nucleotide mix (Roche, Mannheim, Germany)
- Plasmid mini kit (Qiagen, Netherlands)
- Plasmid purification maxi kit Jetstar (Genomed, Löhne, Germany)
- Proteinasa K (Roche, Mannheim, Germany)
- QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Netherlands)
- QuickChange Site-directed Mutagenesis (Stratagene La Jolla, CA, USA)
- Recombinant Human FGF10 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)
- Recombinant Mouse FGF8b (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)
- Recombinant Mouse Noggin/Fc Chimera (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)
- Recombinant Rnasin Ribonuclease Inhibitor (Promega, Madison, WI, USA)
- RNA DIG-Labeling kit (Roche, Mannheim, Germany)
- Sp6 RNA polimerasa (Promega, Madison, WI, USA)
- SU5402 FGF inhibitor (Calbiochem; Darmstadt, Germany)
- Suero de cabra (Gibco BRL Life-Technologies GmbH, Eggenstein, Germany)
- Suero fetal bovino (Euroclone Life Sciences Division, Pero, Italy)
- Superscript Reverse transcriptase RnaseH-free (Invitrogen Corp; Carlsbad, CA, USA)
- T3 RNA polimerasa (Roche, Mannheim, Germany)
- T4 DNA ligasa (Promega, Madison, WI, USA)
- T7 RNA polimerasa (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
- Trietanolamina (Flucka Chemical Corp; Milwaukee, WI, USA)
- Tripsina (BD; Franklin Lakes, NJ USA)
- Tris base (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO, USA)
- Tritón X-100 (Calbiochem; Darmstadt, Germany)
- tRNA (Sigma-Aldrich Corp; St. Louis, MO)
- Tween 20 (Merck, Darmstadt, Germany)
- Vectashield mounting medium con Dapi a 1.5 µg/ml (Vector Laboratories , Burlingame, CA, USA)
- Vectastain ABC kit (Vector Laboratories , Burlingame, CA, USA)
- X-Gal (Venn Nova, Pompano Beach, FL, USA)
- Xilol (Merck, Darmstadt, Germany)

## Anticuerpos:

- Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (Molecular Probes; Eugene, OR, USA)
- Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes; Eugene, OR, USA)
- Anti-DIG Fab (Roche, Mannheim, Germany)
- Anti-MF20 monoclonal ascites (Developmental Studies of Hybridoma Bank, Iowa, USA)
- Biotin Sp AffiniPure goat anti-mouse IgG (Jackson, West Grove, PA, USA)
- Mouse anti-BrdU monoclonal (Sigma-Aldrich Corp; St. Louis, MO)
- Mouse anti- $\beta$ -catenina monoclonal (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)
- Mouse anti- $\beta$ 1-integrina monoclonal JG22 supernatant (Hybridoma Bank, Iowa, USA)
- Mouse anti-E-cadherina monoclonal (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)
- Mouse anti-laminina monoclonal 3H11 supernatant (Hybridoma Bank, Iowa, USA)
- Phalloidin Conjugates (Molecular Probes; Eugene, OR, USA)
- Rabbit anti-conexina 43/GJA1 (Abcam plc, Cambridge, UK)
- Rabbit anti-fibronectina policlonal (Dako, Glostrup, Denmark)
- Rabbit anti-fosfohistona 3 policlonal (Millipore; Billerica, MA)
- Rabbit anti-GFP polyclonal (Clontech Laboratories/Living colors. Mountain View, CA, USA)
- Rabbit anti-  $\alpha$ -tubulina policlonal (Abcam plc, Cambridge, UK)
- Rabbit anti-ZO-1 (N-term) policlonal (Zymed Laboratories. San Francisco. CA. USA)
- Streptavidin-Cy3 (Jackson, West Grove, PA, USA)
- Wheat Germ Agglutinin Conjugates/WGA (Molecular Probes; Eugene, OR, USA)

## Plásmidos:

- PCAGGS/SE (Stuhmer et al., 2002)
- PCAGGS/EGFP (Momose et al., 1999)
- PCGN- $\beta$ -cat $\Delta$ N (Zhurinsky et al., 2000)
- pCR Blunt (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- pGEMT Easy (Promega, Madison, WI, USA)

## Equipamiento:

- Criostato CM 1900 (Leica, Cambridge, UK)
- Cubres 24x60mm (Menzel-Glaser, Brunswick, Germany)
- Electroporador Intracel TSS20 (Intracel, Frederick, MD 21701)
- Incubador (Mettler, Schwabach, Germany)
- Microinyector (Inject+Matic, Geneva, Switzerland)
- Horno de hibridación (Amersham Life Science, Little Chalfont, Bucks UK)
- Lupa MZI6 (Leica, Cambridge, UK)
- Lupa MZFL III (Leica, Cambridge, UK)



- Microscopio binocular Nikon 90Si (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA)
- Microtomo RM2155 (Leica, Cambridge, UK)
- Moldes de parafina
- OPT 300I scanner (Bioptonic MRC Technology, Edinburgh, Scotland, UK)
- PCR Programmable Thermal Cycler PTC-200 (MJ Research Inc., Waltham, MA)
- Portas Superfrost (Fisher Scientific, Atlanta, GA)

## **Animales:**

- Huevos de pato pekines fecundados (Granja San Fernando, Cantabria, Spain)
- Huevos pollo Rhode Island red fecundados (Granja Santa Isabel Córdoba, Spain y Granja Gibert, Tarragona, Spain)
- Ratones cepa CDI (Harlan, Indianápolis, Indiana, USA)

## **2. Métodos:**

### **2.1 Estadios de los embriones**

Para identificar los estadios de los embriones de pollo nos hemos guiado por la tabla de Hamburger y Hamilton (Hamburger and Hamilton, 1951).

Para identificar los estadios de los embriones de ratón se contaron días a partir de la mañana en el que visualizamos el tapón vaginal en la hembra preñada. Esa mañana se contó como día 0.5 (E 0.5). El recuento de somitos fue otro método utilizado.

Los estadios de desarrollo en embriones de pato fueron asignados mediante la utilización de la siguiente publicación científica: “Desarrollo embrionario en los huevos del pato pequinés” (Kaltöfen, 1971).

### **2.2 Extracción de embriones de ratón y procesamiento para hibridación *in situ* en embriones enteros**

Se sacrificó a la hembra preñada, se abrió el abdomen y se colocó el útero en PBS. Se rasgaron y se retiraron las membranas y se extrajeron los embriones con cuidado, para no dañarlos. Después se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS 16h a 4°C (o toda la noche). Al día siguiente se lavaron dos veces de cinco minutos con PBT (0.1% tritón x-100 en PBS) a temperatura ambiente en agitación y seguidamente se lavaron también durante 10 minutos en agitación a temperatura ambiente, con concentraciones crecientes de metanol en PBT 50%, 75% y metanol puro. Se repitió el lavado con metanol puro. Se almacenaron en metanol a -20°C hasta el momento de su uso.

### **2.3 Extracción de embriones de pollo/pato y procesamiento para hibridación *in situ* en embriones enteros**

Se incubaron los huevos a 38°C, el tiempo necesario para obtener embriones del estadio de desarrollo deseado. Se abrió la cáscara del huevo y se separaron las membranas que recubren el embrión. Se extrajo el espécimen, se lavó en PBS y se fijó en paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS toda la noche a 4°C. Al día siguiente, al igual que con los embriones de ratón, se realizaron dos lavados de cinco minutos con PBT a temperatura ambiente en agitación y a continuación se llevaron a cabo otros tres lavados durante 10 minutos en agitación a temperatura ambiente, con concentraciones crecientes de metanol en PBT 50%, 75% y metanol puro. Finalmente se repitió el lavado con metanol puro. Los embriones pueden ser almacenados en metanol a -20°C hasta el comienzo de la hibridación *in situ*.

### **2.4 Procesamiento de embriones en OCT: congelación de muestras**

Los embriones fueron extraídos e inmediatamente introducidos en paraformaldehído (PFA) 4% libre de RNasas, en donde permanecieron a 4 grados centígrados toda la noche. Después de la fijación, se colocaron en sacarosa 15% en PBS durante 3 horas y a continuación en sacarosa 30% en PBS durante toda la noche. Al día siguiente los especímenes se embebieron en OCT, se orientaron y se congelaron rápidamente en nieve carbónica. Se almacenaron a -80°C.

### **2.5 Procesamiento de embriones en Gelatina-sacarosa: congelación de muestras**

Tras la extracción de los embriones del huevo o de la hembra gestante, se sumergieron en PFA 4% libre de RNasas a 4°C a lo largo de toda la noche. Posteriormente se lavaron los ejemplares con PBS dos veces de 15 minutos a 4°C y en agitación. A continuación, introducimos los especímenes en sacarosa 15% en PBS a 4°C hasta su equilibrado e inmediatamente los introdujimos en una solución de gelatina 7,5%, sacarosa 15% en PBS a 37°C. Primero se creó una base de gelatina-sacarosa en los pocillos de una placa (la base de estos pocillos esta impregnada con lavavajillas, lo cual facilitó posteriormente la extracción de las gelatinas con tejidos embebidos) y se dejó solidificar. Después mediante una pipeta Pasteur de plástico con la punta recortada se depositaron los embriones junto con una gota de gelatina-sacarosa sobre la base solidificada y se orientaron. Una vez sólidos, se recubrieron con gelatina-sacarosa y se dejaron otra vez solidificar. El siguiente paso fue sacar la totalidad del pocillo de la placa con las muestras embebidas y mediante una cuchilla confeccionar los bloques. Por ultimo se pegaron los bloques con una gota de OCT a los moldes y se congelaron mediante isopentano a -70/-75°C durante 1 minuto. Finalmente los bloques se guardaron a -80°C

## **2.6 Procesamiento de embriones en parafina**

Los embriones sacados de la hembra/huevo fueron fijados en PFA 4% a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se lavaron en PBS dos veces de 15 minutos a 4°C y fueron deshidratados mediante lavados en soluciones ascendentes de etanol en agua de 30 minutos a 4°C (30%, 50%, 70% (2 lavados) 85%, 95% y 100% (2 lavados)). Estos lavados se realizaron a 4°C. Seguidamente, los embriones se lavaron tres veces de 30 minutos con xilol, a temperatura ambiente y dos veces de 30 minutos con parafina a 65°C. A continuación se embebieron en parafina y se colocaron en el interior de un molde en la posición óptima para el plano en el que se deseaba cortar.

## **2.7 Hibridación *in situ* en embriones enteros**

Para los ensayos de hibridación *in situ* se utilizaron protocolos estándar descritos en publicaciones anteriores (Nieto et al., 1996; Wilkinson and Nieto, 1993).

### **2.7.1 Embriones o patas/alas de pollo**

Rehidratamos, a temperatura ambiente, los embriones o las patas/alas con concentraciones decrecientes de metanol en PBT: 75%, 50% y PBT puro dos veces, 10 minutos con cada disolución. A continuación tratamos con proteinasa K en PBT (a 30 µg/ml durante 30 minutos si son patas de estadios 28HH-33HH o 20 µg/ml durante 20 minutos si son embriones de estadios 20HH-26HH o 10 µg/ml durante 10 minutos si son embriones de estadio 14HH-19HH) a temperatura ambiente y con agitación. Pasado ese tiempo retiramos la solución y lavamos dos veces con PBT, el primero, muy rápidamente, el segundo de 5 minutos y en agitación. Después añadimos la solución de refijado (glutaraldehído 0.25% en PFA 4%) y dejamos actuar durante 20 minutos a temperatura ambiente con agitación. Enjuagamos una vez y lavamos 2 veces de 5 minutos cada una con PBT a temperatura ambiente y en agitación. Sustituimos el PBT por solución de prehibridación (formamida 50%, 5x SSC pH 4.5, 50 µg/ml heparina, 20 µg/ml tRNA de levadura, 7% Blocking Reagent Solution, 1% SDS) precalentada a 65°-70°C. Esperamos a que los embriones se equilibren y cambiamos la solución de prehibridación, a continuación incubamos los tubos a 65°C-70°C 2 horas en agitación en el horno de hibridación. Tras ese tiempo, añadimos la sonda 0,75-1,25µg por cada ml sobre la solución de prehibridación sin dejar que baje la temperatura) e hibridamos a 65°-70°C toda la noche en agitación. Al día siguiente, realizamos tres lavados de 20 minutos a 65-70°C con solución de posthibridación 1: 50% formamida, 5x SSC libre de RNasas, 1% SDS, en agua libre de RNasas y otras tres veces de 20 minutos a 65-70°C con solución de posthibridación 2: 50% formamida, 2x SSC, 0.1% SDS en agua libre de RNasas. Seguidamente enjuagamos con TBST (TBS 1x, 1% Tween 20) y lavamos con TBST 5 minutos con agitación a temperatura ambiente. Bloqueamos con una solución 20% de suero de cabra en TBST durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación y a continuación con la solución de bloqueo restante preparamos una dilución del anticuerpo anti-DIG AP 1:2000 en la que permanecerán los embriones durante toda la noche a 4°C en agitación. Lavamos 5 veces de 1 hora con TBST y después dejamos lavando en TBST a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con NTMT pH 9.5 (NaCl 100mM, Tris HCl pH 9.5, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Tween20) y la reacción se

reveló con BM purple. Cuando la señal alcanzó un nivel apropiado, se realizó un lavado con NTMT y se dejaron los embriones en PFA 4% donde fueron almacenados a 4°C indefinidamente.

### **2.7.2 Embriones y patas de ratón**

Se rehidrataron los embriones con concentraciones decrecientes de metanol en PBT: 75%, 50% y PBT puro dos veces 10 minutos con cada disolución. Los embriones fueron blanqueados durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación con solución de blanqueo (6% de agua oxigenada en PBT). Se lavaron tres veces con PBT de 10 minutos a temperatura ambiente con agitación. Después se trataron con proteinasa K (a 10 µg/ml) en PBT a diferentes tiempos dependiendo del estadio de los embriones (E 9.5-E 10: 10 minutos + 1 minuto más por estadio que se pasaba de estos valores) a temperatura ambiente y con agitación. Pasado ese tiempo, se retiró la solución con proteinasa K y se lavó con PBT-glicina durante 5 minutos para parar la reacción. Se hicieron dos lavados de 5 minutos y en agitación con PBT y se refijó en una solución de glutaraldehído al 0.25% en PFA 4% durante 20 minutos. A continuación se enjuagó una vez y se lavó 2 veces de 5 minutos cada una con PBT.

Se retiró el PBT y se añadió la solución de prehibridación (formamida 50%, 25% SSC pH 4.5, 50 µg/ml heparina, 20 µg/ml tRNA de levadura, 7% Blocking Reagent Solution, 1% SDS) precalentada a 65°-70°C. Una vez que los embriones se equilibraron, se renovó la solución de prehibridación, e inmediatamente se incubaron en el horno los tubos a 65°-70°C 2 horas en agitación. Pasado ese tiempo, se añadió la sonda (0,75-1,25µg por cada ml) y se hibridó a 65°-70°C toda la noche en agitación.

Se realizaron dos lavados de 30 minutos a 65-70°C con solución de posthibridación 1: 50% formamida, 5x SSC libre de Rnasas, 1% SDS, en agua libre de Rnasas y otras dos veces de 30 minutos a 65-70°C con solución de posthibridación 2: 50% formamida, 2x SSC, 0.1% SDS en agua libre de Rnasas. Después se enjuagaron los embriones con TBST y se llevaron a cabo tres lavados con TBST de 10 minutos cada uno con agitación a temperatura ambiente. Se incubaron los embriones con solución de bloqueo (10% de blocking solution, 20% de suero fetal bovino en TBST) 1 hora y media a temperatura ambiente con agitación, a continuación se diluyó el anticuerpo anti-DIG AP 1:2000 en solución de bloqueo y se sustituyó la solución de bloqueo de los embriones por esta nueva solución con el anticuerpo dejándola actuar toda la noche a 4°C en agitación.

Los embriones se lavaron con TBST 5 veces durante 1 hora cada lavado a temperatura ambiente con agitación y a continuación se enjuagaron con NTMT pH 9.5 (NaCl 100mM, Tris HCl pH 9.5, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Tween20) rápidamente. Se realizaron tres lavados de 10 minutos con NTMT pH 9.5 a temperatura ambiente con agitación. Para el revelado se utilizó BM purple en total oscuridad a temperatura ambiente y en agitación. Una vez revelado, se enjuagó con NTMT, y se fijaron las muestras en PFA 4%. Los embriones se guardaron a 4°C.

## **2.8 Cortes en parafina de embriones completos sobre los que se ha realizado hibridaciones *in situ*.**

Una vez se realizó la hibridación *in situ* y se tuvieron los embriones almacenados en PFA 4%, se lavaron dos veces con PBS a temperatura ambiente y en agitación durante 10 minutos cada lavado. Seguidamente se realizaron los lavados en tres diferentes soluciones: una solución de Etanol al 25% en PBS, otra al 50% y otra al 75% (20 minutos cada uno). Después los embriones se lavaron dos veces con Etanol 100% durante 20 minutos cada uno y otras dos veces con xilol también 20 minutos cada lavado.

Por último las muestras se lavaron en parafina fundida 2 veces en el horno a 60°C durante 1 hora cada lavado. Se retiró la parafina fundida y se añadió más parafina fundida en un molde. A continuación se colocó el espécimen en el molde y se dejó enfriar. Se llevaron a cabo cortes en el micrótopo de entre 10 y 25  $\mu\text{m}$ . Se dejaron secar los cortes durante toda la noche a temperatura ambiente y se desparafinaron con tres lavados de 3 minutos en xilol. Montamos con Eukitt.

## **2.9 Hibridación *in situ* en secciones de criostato**

Se realizaron secciones en criostato de 10-15 $\mu\text{m}$  y se colocaron sobre portas *superfrost* dejándose secar durante 2 horas. En caso de utilizar bloques con Gelatina-sacarosa las secciones previamente se lavarían a 37°C durante 15 minutos para eliminar restos de gelatina. A continuación, los cortes se lavaron con PBS (libre de RNasas) durante 5 minutos y se refijaron con PFA 4% durante 10 minutos. Durante estos pasos se diluyeron 0,75-1,25 $\mu\text{g}$  de la sonda en 1ml de solución de prehibridación (1x sal (11.4 g/ml de NaCl, 1.4 g/ml Tris-HCl pH 7.5, 0.134g/ml Trisbase, 5mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 5mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.05M EDTA); 50% formamida; 10% sulfato dextrano, 1mg/ml tRNA; 1x Denhardt's solution) precalentada a 65°-70°C (volumen aproximado para diez portas). Después del refijado, se lavaron los portas con PBS durante 5 minutos y se llevó a cabo la fase de prehibridación en el que se añadió, sobre cada uno, 400-500  $\mu\text{l}$  de solución de prehibridación, previamente precalentada a 65°-70° C, durante 5 minutos. A continuación, se retiró esta solución y de nuevo se añadieron 100  $\mu\text{l}$  por porta de la solución de prehibridación a 65° C, esta vez con la sonda diluida. Se dejó hibridando durante toda la noche en el horno de hibridación a 65°-70°C. Para evitar la evaporación, el proceso de prehibridación se realizó en una caja con solución de posthibridación (50% formamida, 1x SSC pH 4.5, 0.1% Tween 20) en el fondo, de modo que se formó una atmósfera húmeda. Así mismo se colocaron cubres sobre los portas.

Al día siguiente, se trasladaron los portas a una jarra Couplin de cristal con solución de posthibridación precalentada a 65°C. Se llevaron a cabo dos lavados de 30 minutos con esta solución dentro del horno (a 65°C). Después se realizaron dos lavados de 30 minutos a temperatura ambiente con MABT (100mM de ácido maleico; 150mM de NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5). Antes de la incubación con el anticuerpo, se bordearon con un rotulador hidrofóbico los laterales de cada porta y se bloqueó con 600  $\mu\text{l}$  (por porta) con solución de bloqueo (2% blocking reagent y 20% de suero de cabra en MABT) durante 1 hora. De nuevo, estos pasos se llevaron a cabo en posición horizontal. A continuación se realizó la dilución del anticuerpo anti-DIG-AP 1:2000 en

solución de bloqueo y añadimos 200 µl por porta. Se incubaron toda la noche a 4°C en cámara húmeda compuesta por MABT.

Al día siguiente, se efectuaron cinco lavados de 20 minutos cada uno con MABT a temperatura ambiente y después otros dos lavados de 10 minutos en ligera agitación con AP-buffer (100mM Tris HCl pH 9.5; 150mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>; 0.1% Tween 20; 0.5 mg/ml Levamisol). Para revelar se utilizó BM Purple AP substrate, 200 µl por porta. Se dejó revelando en oscuridad de unas horas hasta dos días dependiendo de la sonda. La reacción de revelado fue parada con agua y se montaron los portas con Eukitt.

## **2.10 Hibridación *in situ* en secciones de parafina**

Se realizaron secciones de microtomo de 10µm y se colocaron en portas *superfrost*. Se dejaron secar durante toda la noche a 37°C.

Al día siguiente se desparafinaron los portas mediante dos lavados con xilol de 10 minutos y se lavaron dos veces durante 10 minutos con etanol absoluto. Las secciones se rehidrataron con lavados de 5 minutos en concentraciones decrecientes de etanol en agua (95%, 90%, 70%, 50% y 30%).

Se llevó a cabo un lavado con PBS de 5 minutos y se refijó con PFA 4% durante 20 minutos. A continuación, las secciones se lavaron de nuevo con PBS dos veces de 5 minutos. Se permeabilizó el tejido digiriendo con proteinasa K 10 µg/ml 10 minutos a 37°C, seguidamente se enjuagó con PBS y se lavó durante 5 minutos con PBS. Con PFA 4% se refijaron las muestras durante 5 minutos y se lavaron otros cinco minutos con PBS.

A continuación, los cortes se lavaron con HCl 0.2N durante 15 minutos y se aclararon con dos lavados de PBS de 5 minutos. Se sustituyó el PBS por 0.25% de anhídrido acético en trietanolamina 0.1M pH 8 y se dejó en agitación durante 10 minutos. Se hicieron dos lavados sucesivos de 5 minutos, el primero con PBS, y el segundo con agua. Después se retiró el agua y se dejaron las secciones en buffer de prehibridación (50% formamida, 5xSSC pH 5.5, 1xDenhardt's, 0.1% tween 20, 0.1% Chaps y 50µg/ml tRNA), previamente precalentado, durante 2 horas a 65°C. Pasadas las 2 horas, se sustituyó el buffer de prehibridación por un buffer de igual composición al que le fue añadida la sonda de RNA marcada con digoxigenina (1µg-3µg por ml de buffer). Se colocaron cubres en cada porta y se dejó hibridar a 65° C durante toda la noche. Para evitar que las secciones se secasen se generó una cámara húmeda con 50% formamida y 5xSSC pH 5.5.

Al día siguiente se realizaron dos lavados de 30 minutos a 65°C con la solución de posthibridación 1 (50% Formamida, 5XSSC pH 5.5, 1% SDS) y dos lavados más, también de 30 minutos a 65°C, con la solución de posthibridación 2 (50% Formamida, 2xSSC, 0.2% SDS). Seguidamente, las secciones se lavaron tres veces durante 5 minutos con MABT (100mM de ácido maleico; 150mM de NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5) y se perfilaron los portas con un rotulador hidrofóbico. Las muestras se bloquearon con 2% blocking reagent y 20% de suero de cabra en MABT durante 2 horas. A continuación, los cortes se incubaron con anti-DIG-AP 1:2000 en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C.

Después de toda la noche en presencia del anticuerpo, se realizaron tres lavados rápidos de 10 minutos en MABT y, seguidamente, tres lavados de una hora cada uno en MABT para eliminar restos de anti-DIG-AP. Tras este proceso, se llevaron a cabo tres lavados de 10 minutos en AP-buffer (NaCl 0.1M, MgCl<sub>2</sub> 0.05M, Tris HCl pH 9.5

0.1M, Tween 20 0.1% y Levamisol 1mM). A continuación, las secciones se revelaron con BM Purple AP substrate en oscuridad durante un periodo variable comprendido entre 6h y 48h.

Una vez obtenido el grado de revelado que se deseaba, se paró la reacción con 2 lavados de PBS de 5 minutos, se refijó con PFA 4% durante 15 minutos y se deshidrataron los portas lavando con 30% etanol, 50% etanol, 70% etanol, 85% Etanol, 90% etanol, 95% etanol (todas estas diluciones fueron de etanol en agua) y 100% etanol, esta última dos veces. Estos lavados fueron de cinco minutos. Después se realizaron dos lavados con xilol de cinco minutos cada uno y se montaron los portas con Eukitt.

## **2.11 Inmunohistoquímica MF20**

En embriones de pollo 25HH previamente embebidos en OCT se realizaron secciones en el criostato de 10-15  $\mu\text{m}$  y se dejaron secar durante 1 hora a temperatura ambiente. Los cortes se fijaron durante 4 horas en una dilución de etanol 70% en agua a 4°C y a continuación se lavaron tres veces con PBT (0.1% Tween 20 en PBS) durante 5 minutos. Las muestras se permeabilizaron con un lavado de 10 minutos de 0.05% Tritón X-100 en PBS y seguidamente se lavaron durante 5 minutos con PBT. Después se hizo un lavado de 10 minutos en 0.03%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 0.1% Tween 20 en PBS y se bloqueó con kit avidina/biotina (15 minutos cada reactivo separados por un lavado de 5 minutos de PBT). Seguidamente se llevó a cabo un lavado con PBT y se bloqueó con 10% Goat serum, 0.1% Tween 20 en PBS durante 1-2 horas a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C. A continuación, las secciones se incubaron con el anticuerpo primario MF20 a concentración 1:100 en 2% Goat serum en PBT a temperatura ambiente durante 1-2 horas o a 4°C durante toda la noche. Para eliminar restos de anticuerpos los cortes se lavaron tres veces con PBT (5 minutos cada lavado) y luego se incubaron con el anticuerpo secundario goat anti-mouse biotina a dilución 1:500 en PBT durante 1 hora a temperatura ambiente. Durante este proceso se mezcló en un tubo 1 gota del reactivo A y una gota del reactivo B del kit ABC de Vectastain en 5 ml de PBS. Se realizaron tres lavados de 5 minutos en PBT y se incubó con la mezcla A+B durante 1 hora. Se reveló con pastillas de DAB y cuando se alcanzó el nivel de revelado deseado, se paró la reacción con PBT, se dejó secar y se montó con Aquatex.

## **2.12 Inmunohistoquímica en secciones de parafina: $\alpha$ -tubulina, E-cadherina, Conexina43, Fibronectina, $\beta$ -catenina y ZO-1**

En embriones incluidos en parafina se realizaron cortes de 4 a 6  $\mu\text{m}$ . Se secaron durante toda la noche a 37°C y al día siguiente se desparafinaron en xilol y se rehidrataron en concentraciones decrecientes de etanol en agua. Se lavaron en agua durante 5 minutos, se aclararon tres veces en agua destilada y se llevó a cabo el desenmascaramiento.

$\alpha$ -tubulina	E-cadherina	Conexina43	Fibronectina	GFP	$\beta$ -catenina	ZO-1
Buffer Citrato 10mM pH6 en microondas a máxima potencia 15 minutos y atemperar 15 minutos.	Buffer Citrato 10mM pH6 en microondas a máxima potencia 15 minutos y atemperar 15 minutos.	Pepsina 2% en HCl 0,01N a 37°C durante 20 minutos	Pepsina 0,4% en HCl 0,01N a 37°C durante 30 minutos	Buffer Citrato 10mM pH6 en microondas a máxima potencia 15 minutos y atemperar 15 minutos.	Buffer Citrato 10mM pH6 en microondas a máxima potencia 15 minutos y atemperar 15 minutos.	Pepsina 2% en HCl 0,01N a 37°C durante 5 minutos

A continuación se aclaró con PBS tres veces y se perfiló el porta con un rotulador hidrofóbico. Después se lavó en PBS durante 5 minutos y se llevó a cabo la incubación con el anticuerpo primario a la dilución indicada en 10% suero de cabra en PBS.

$\alpha$ -tubulina	E-cadherina	Conexina43	Fibronectina	GFP	$\beta$ -catenina	ZO-1
Rabbit anti- $\alpha$ -tubulina policlonal 1/2500 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda.	Mouse anti-E-cadherina monoclonal 1/2000 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda.	Rabbit anti-Conexina 43 policlonal 1/2000 Toda la noche a 4° en cámara húmeda.	Rabbit anti-fibronectina policlonal 1/800 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda.	Rabbit anti-GFP policlonal 1/250 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda.	Mouse anti- $\beta$ -catenina monoclonal 1/100 Toda la noche a 4° en cámara húmeda.	Rabbit anti-ZO-1 (N-term) policlonal 1/250 toda la noche a temperatura ambiente en cámara húmeda.

Seguidamente los portas se enjuagaron tres veces en PBS, se lavaron 5 minutos y se pusieron a incubar con el anticuerpo secundario 1 hora a temperatura ambiente.

$\alpha$ -tubulina	E-cadherina	Conexina43	Fibronectina	GFP	$\beta$ -catenina	ZO-1
Ratón: Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG 1/500 Pollo: Biotin Sp AffiniPure goat anti-rabbit IgG 1/500	Ratón: Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG 1/500 Pollo: Biotin Sp AffiniPure goat anti-mouse IgG 1/500	Ratón: Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG 1/500 Pollo: Biotin Sp AffiniPure goat anti-rabbit IgG 1/500	Ratón: Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG 1/500 Pollo: Biotin Sp AffiniPure goat anti-rabbit IgG 1/500	Pollo: : Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG 1/500	Ratón: Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG 1/500 Pollo: Biotin Sp AffiniPure goat anti-mouse IgG 1/500	Ratón: Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG 1/500 Pollo: Biotin Sp AffiniPure goat anti-rabbit IgG 1/500



Se lavaron los portas tres veces con PBS y se realizó un lavado de 5 minutos tras el cual, en el caso de inmunohistoquímica en embrión de pollo, se incubó con estreptavidina-Cy3 (1/500) 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda y en oscuridad.

Posteriormente se aclararon en PBS tres veces y se lavaron en este mismo tampón durante cinco minutos. Montamos con Vectashield con Dapi.

### **2.13 Inmunohistoquímica en secciones de criostato: $\alpha$ -Laminina, $\beta$ 1-integrina**

Los embriones de pollo embebidos en gelatina-sacarosa y almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  se cortaron a  $8\text{ }\mu\text{m}$  y se dejaron secar al aire durante 2 horas. Se desgelatinizaron mediante un lavado de 15 minutos de PBS a  $37^{\circ}\text{C}$  y a continuación los cortes se lavaron dos veces en TBST (0,1% tween en TBS) durante 5 minutos. Posteriormente se llevó a cabo un proceso de permeabilización en TBST+ 0,5% TritonX-100 durante 10 minutos y se realizó un aclarado de 5 minutos en TBST. Utilizando un rotulador hidrofóbico se perfilaron los portas, se lavaron con TBST durante 5 minutos e inmediatamente se incubaron con el anticuerpo primario durante toda la noche en cámara húmeda a  $4^{\circ}\text{C}$  y en oscuridad. La concentración empleada en este paso fue de 1/3 del anticuerpo en una solución de TBST con 14% de suero de cabra. Al día siguiente, las secciones se enjuagaron dos veces de 5 minutos cada una en TBST y se les añadió el anticuerpo secundario Biotin Sp AffiniPure goat anti-mouse IgG a una dilución 1/500. Se dejó incubando durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda y en oscuridad. A continuación, los cortes se lavaron dos veces de 5 minutos en TBST y se llevó a cabo la incubación con estreptavidina-Cy3 a una dilución 1/500 durante 1 hora, a temperatura ambiente, en cámara húmeda y oscuridad. Posteriormente, tras dos lavados de 5 minutos en TBST, los portas se montaron con Vectashield con Dapi.

### **2.14 Marcaje de los filamentos de actina en secciones de criostato con Phalloidina**

Se realizan cortes de  $8\text{ }\mu\text{m}$  en los diferentes embriones congelados y se dejaron secar a temperatura ambiente durante dos horas. Después se eliminan los restos de gelatina mediante un lavado de 15 minutos en PBS a  $37^{\circ}\text{C}$  y se vuelven a lavar dos veces de cinco minutos en este tampón, esta vez, a temperatura ambiente. Permeabilizamos las secciones con PBT (PBS + 0,5% TritónX-100) durante 10 minutos y las aclaramos tres veces con PBS. Tras bordear los portas con el rotulador hidrofóbico, los lavamos una vez con PBS y los incubamos durante 45 minutos con Phalloidina a una dilución 1/200 en 1% BSA en PBS a temperatura ambiente en cámara húmeda. Posteriormente, se enjuagó con PBS tres veces y se lavó durante cinco minutos en este tampón para, a continuación, montar los portas con Vectashield con Dapi.

## **2.15 Marcaje de contorno celular con Fitohemaglutinina sobre cortes de parafina**

Los bloques de parafina fueron seccionados a un grosor comprendido entre los 4 y 6  $\mu\text{m}$ . Se llevó a cabo la desparafinización en xilol 10 minutos y la rehidratación en concentraciones decrecientes de etanol en agua (100%, 100%, 95%, 90%, 70%, 50% y 30%, 5 minutos cada una). Se enjuagaron en agua destilada tres veces y, sobre el contorno de los portas, se pasó un rotulador hidrofóbico. Posteriormente se realizaron dos lavados de 5 minutos en PBS y se incubó durante 45 minutos con Fitohemaglutinina 1/100 a temperatura ambiente en cámara húmeda. A continuación, se llevaron a cabo tres lavados de 5 minutos en PBS y se montó con Vectashield con Dapi.

## **2.16 Tinción Lac-Z**

Para la realización de la tinción Lac-Z, se extrajeron los embriones y se fijaron en glutaraldehído 0,125% en PBS durante 10-45 minutos dependiendo del estadio. Después de esta fijación, las muestras se lavaron dos veces de 10 minutos en PBS y a continuación, y durante 10 minutos, con tampón de lavado (0.1M Tampón fosfato pH 7.3,  $\text{MgCl}_2$  2mM, 0,11% Deoxicolato sódico, 0,2% Igepal, Tris HCl pH 7.3 20mM). Finalmente los embriones se tiñeron con la solución de revelado (1mg/ml X-Gal, Ferrocianuro potásico 5mM y Ferrocianato potásico 5mM en buffer de lavado).

## **2.17 Detección de apoptosis mediante TUNEL**

Sobre embriones incluidos en parafina se realizaron cortes de 5  $\mu\text{m}$  y se dejaron secar durante toda la noche en una estufa a 37°C. A la mañana siguiente se desparafinaron con dos lavados de xilol de 5 minutos y se hidrataron en concentraciones decrecientes de etanol en agua. A continuación se lavaron en agua durante 5 minutos, se pasaron tres veces por agua destilada y tres veces más por PBS. Las secciones se lavaron con PBS durante 5 minutos y seguidamente se permeabilizaron las membranas con 0,5% tritón X-100 en PBS durante 10 minutos. Seguidamente, las muestras se aclararon tres veces con PBS y se lavaron durante 5 minutos para eliminar restos de detergente. Después los cortes se preincubaron con buffer TdT 1x,  $\text{CoCl}_2$  1mM durante 15 minutos a temperatura ambiente para, posteriormente, ser incubados con TdT reaction mix (que incluye el enzima Transferasa terminal recombinante y los nucleótidos biotinilados) 1 hora a 37°C. En estos dos últimos pasos las secciones se mantuvieron en cámara húmeda y en oscuridad. La reacción se paró con dos lavados de 5 minutos de 0,01% tween en PBS y se retiraron restos de detergente con un lavado de PBS de 5 minutos. A continuación se incubó con anticuerpo secundario avidina-Cy3 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda y en oscuridad. Por último los cortes se enjuagaron con PBS tres veces y se llevó a cabo un lavado durante 5 minutos para, seguidamente, montar las secciones con Vectashield.

## **2.18 Detección de proliferación celular mediante PH3**

Se realizaron secciones de 5µm de los embriones de ratón embebidos en parafina y se dejaron secar a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se desparafinaron los cortes con xilol y se hidrataron en concentraciones decrecientes de etanol en agua. Se aclararon las muestras con agua corriente y se lavaron tres veces con agua destilada. Después se procedió al desenmascaramiento del antígeno mediante un lavado en buffer citrato 10 mM pH=6 en el microondas a la máxima potencia. Resultó importante introducir las secciones en el tampón previamente calentado. Posteriormente se atemperaron los cortes durante 15 minutos y se enjuagaron con PBS. A continuación los portas fueron perfilado con un rotulador hidrofóbico y se lavaron con PBS durante 5 minutos. Se incubaron las secciones con el anticuerpo primario Rabbit anti-fosfohistona 3 a una dilución 1/200 en 10% suero de cabra en PBS durante 1 hora. Seguidamente, las muestras se enjuagaron tres veces en PBS y lavaron durante 5 minutos en este tampón. Se incubó con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG monoclonal 1/500 en cámara húmeda, a temperatura ambiente, durante una hora. Después los cortes se aclararon tres veces y se lavaron durante 5 minutos en PBS. A continuación los portas se montaron con Vectashield con Dapi.

## **2.19 Detección de proliferación celular mediante BrdU**

En los embriones de pollo electroporados se realizó un marcaje *in ovo* con BrdU. Para ello se abrió una ventana eliminando el papel celo necesario para descubrir el embrión y se inyectó en un vaso sanguíneo la solución de BrdU 5mg/ml. En la solución inyectada, para facilitar su visualización, se añadió Fast Green 0,1%. Los embriones inyectados se taparon y se incubaron durante 30 minutos a 38°C para terminar de incorporar el marcaje. Pasado este tiempo, se extrajeron los embriones, se lavaron en PBS y se fijaron durante toda la noche en PFA 4% a 4°C. Al día siguiente, pasando por concentraciones crecientes de etanol y xilol tal y como se describe anteriormente, se embebieron en parafina. Posteriormente se realizaron cortes de 5µm y se dejaron secar en una estufa 37° durante toda la noche. Se desparafinaron los cortes con xilol y se rehidrataron en concentraciones decrecientes de etanol en agua destilada. Las secciones se lavaron en agua durante 5 minutos y se aclararon tres veces en agua destilada. El DNA fue parcialmente desnaturalizado con un lavado de 30 minutos de HCl 2N a 37°. A continuación, las muestras se aclararon tres veces con PBS y lavaron también en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se llevó a cabo el desenmascaramiento antigénico mediante tripsina 0,01% en cámara húmeda y posteriormente se pasaron las secciones tres veces por PBS. Los cortes se lavaron con PBS durante 5 minutos y se incubaron con el anticuerpo primario Mouse anti-BrdU 1/50 en 10% suero de cabra en PBS durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda y oscuridad. Al día siguiente se enjuagó tres veces con PBS y se lavó durante 5 minutos en este mismo tampón. Las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG 1/500 en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda y oscuridad. A continuación se aclaró tres veces en PBS y se realizó un lavado de 5 minutos en este tampón. Posteriormente los portas se montaron con Vectashield con Dapi.

## **2.20     OPT**

Para llevar a cabo el procesamiento de los embriones teñidos con X-Gal para OPT (Tomografía de proyección óptica) se siguió el protocolo descrito en (Sharpe, 2002; Sharpe et al., 2002). NRecon y Bioptonic viewer fueron los programas informáticos utilizados para la reconstrucción y el procesamiento de los datos tridimensionales.

## **2.21     Tinción de cartílago con Alcian green**

Se extrajeron los embriones a una placa con PBS, se decapitaron y se evisceraron. Se fijaron toda la noche con ácido tricloroacético (TCA) al 5% en agua, con agitación y a temperatura ambiente (todos los tratamientos fueron con agitación y a temperatura ambiente si no se indica lo contrario). Al día siguiente, los embriones se lavaron una vez con agua, y a continuación se trataron como mínimo 2 horas con alcohol ácido (70% EtOH, 1% HCl). Después se dejaron toda la noche en Alcian green al 0,1% (se puede reutilizar). Tras esto se lavaron una vez rápidamente con EtOH 70%, y se volvieron a dejar en EtOH 70% al menos 2 horas. Luego se hizo un cambio a 90% EtOH, y tras al menos 2 horas, otro a 100% EtOH. Por último se cambió de nuevo a 100% EtOH y se dejó toda la noche. Al día siguiente los embriones se pasaron a recipientes de cristal con metil salicilato (sin agitación), hasta que se transparentaron. Se almacenaron en este compuesto.

## **2.22     Tinción de cartílago y hueso con Alcian blue y Alizarin red**

Las patas y alas de los embriones son extraídas y fijadas en Etanol 95% durante toda la noche. Todos los pasos son en agitación y a temperatura ambiente. A la mañana siguiente, se tiñen con solución Alcian blue (150 mg Alcian blue, 800 ml de Etanol 98% y 200 ml de Ac. Acético) también durante toda la noche. Después se deja 2 horas en Etanol 95% y a continuación en KOH 2% durante 30 minutos (patas/alas de día 9, 10 y 11) o 1 hora (patas/alas de 12, 13 y 14) o 2 horas (patas 15) o 2 horas y media (patas/alas 16 y 17). Teñimos con solución Alizarin red (50 mg/l de Alizarin red en solución 2% KOH) durante 2h y media (patas/alas de día 9 y 10), 5 horas (patas/alas de día 11) y durante toda la noche (estadios superiores). Clareamos con una solución 20% Glicerol y KOH 1%. Guardamos las patas teñidas en una solución 50% Glicerol 50% Etanol.

## **2.23     Síntesis de sondas**

### **2.23.1 Sonda mArid3b de ratón**

Para sintetizar esta sonda se realizó una PCR a partir de una mezcla de cDNA de ratón de E 9.5 y E 11.5 con la siguiente pareja de oligos, localizados en el interior de la secuencia codificante del gen:

Oligo 5': 5'-CAA GAA CCC AGA GCA ACA CC-3'

Oligo 3': 5'-**ATTTAGGTGACACTATAGAA**GAG TAG AGC CCG CAA  
TGA GG-3'

El oligo 3' contiene la secuencia promotora de la Sp6 RNA polimerasa en extremo 5' (color verde).

Las condiciones de la reacción de PCR fueron:

94°C	3'		
94°C	30"	}	2 veces
60°C	30"		
72°C	2'		
94°C	30"	}	1 vez
58°C	30"		
72°C	2'		
94°C	30"	}	2 veces
56°C	30"		
72°C	2'		
94°C	30"	}	1 vez
54°C	30"		
72°C	2'		
94°C	30"	}	34 veces
52°C	30"		
72°C	2'		
72°C	5'		
4°C	.....		

Se purificó la banda obtenida, de unos 1200 pares de bases, con el kit de extracción de gel de Qiagen y se realizó una transcripción *in vitro* con la RNA polimerasa Sp6 y con ribonucleótidos marcados con digoxigenina (Dig RNA labelling mix).

### **2.23.2 Sonda cArid3b de pollo**

Con el fin de obtener una secuencia apropiada para la generación de una sonda específica para pollo, partimos de la secuencia del cDNA del *Arid3b* en ratón obtenida en la base de datos Ensembl Genome Browser ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). A continuación, se llevó a cabo una búsqueda por homología en la base de datos de ESTs de pollo de Manchester y se localizó una secuencia EST que correspondía a un fragmento de la región codificante de este gen.

## Secuencia EST del gen *Arid3b* de pollo.

603363223F1 clonID='ChEST258m6' chicken ovary

```
CACGCGGGCTAGCACAGGAAGATGAGGAGGAAGAGGAAGCGGGGTTGGAA
GGAGGAGATCTGGAGGATGCTGCTGATGTGACTGGAAAAGAATCCTGCTCC
GCTCTGAAATATTTTCACGCTCCCAAAGTTGCCCAACCACAACCAAAGAGTGG
CCTCTACCTCGAATCCTCTTCCGGCCTCAGGGCACCAGAGGGGACAGCAGG
GCAAAGAAGAACAGGGTAAGGAACTACTAAGCAGCCATATGCCGGCTCCC
CGTCTGGACGCCAGAAGTGGAGATTGGATGAGCAGCTCAAACAGAACGGCA
ATGTGACCTGGAGTGATGAAGGTGATGGATGCCGAGGAAGAGAAATTTAC
GAGACTTTGCCAAGCTTTATGAACTGGATAGTGACCCTGAACGGAAAGAGTT
CCTGGATGACCTCTTCATCTTCATGCAGAAGAGGGGGCAAGTCGTGGCTTA
GGCTGCTTGATGGTGGGGAAGTCCCTGCAGTGGGCATGCTCCTCAATGGAG
GAGATGGGACTTACCTCCTGTGAGCCTGCAAGCATCATAGAATCACCAAGGT
TGGAAAAGACCTCTGAGATCATCCAGTTCAACCTGTCTTAGGTGGCAGTTTC
CTTTAACGTCATCAGCCTGCTCAGATTTCCGGTATGAATCTGAAGTCTGGCT
AAGAGAGGATGAAGAGCAGGGACAAGCCAGCTTGGGTAGGTGAGGAATGCC
TCAAAAA
```

Los clones fueron solicitados, se crecieron, y el plásmido que contenía nuestra EST de interés se extrajo. Tras linearizarlo, se realizó una transcripción *in vitro* usando la RNA polimerasa T7 con ribonucleótidos marcados con digoxigenina (Dig RNA labelling mix).

### 2.23.3 Otras sondas

Sonda	Especie/Proveedor	Especie/Proveedor
Fgf8	Pollo/ Miguel Torres	Ratón/ Shankar
Enl	Pollo/ Joyner	Ratón/ Rossant
Wnt7a	Pollo/ Tickle	Ratón/ McMahon
Bmp7	Pollo/ Marian Ros	Ratón/ Nieto
Lmx1b	-	Ratón/ Marian Ros
Fgf10	-	Ratón/ Marian Ros
Sp8	Pollo/ Miguel Torres	Ratón/ Miguel Torres
Msx2	-	Ratón/ Miguel Torres
Dkk1	-	Ratón/ Rüther
Serrate2	-	Ratón/ Jose Luis de la Pompa
Shh	-	Ratón/ Paola Bovolenta

La síntesis de una sonda para *Bambi* en el pollo se llevó a cabo a partir de una secuencia encontrada en la base de datos de ESTs de pollo de Manchester. Dicha secuencia mostraba un alto grado de homología con la conocida en ratón.

### **Secuencia EST del gen *Bambi* de pollo.**

>60348273|FI cloneID='ChEST372n8' stage 36 limbs

```
CTGTCATGAAGATATGTGCAATTACAGAGGACTGCACGAGTTTGTCTCCTTC
CAAGGGTGAGACTTCAGGACAAGGGAGCAGATATCAACATGACAGCAAGAA
TCTTATACCAAGGTACAGGAACTGACCTCTTCGAAAGAATTATGGTTCAGG
GCAGCTGTAATTGCTGTTCTATAGCTGGTGGGCTCATTTGGTGCTCCTTAT
CATGCTGGCCTTGCGGATGCTCAGGAGTGAAAATAAGAGACTGCAAGATCA
ACGACAGCAAATGCTCTCCCGTTTGCCTATAGTTTTTCATGGACATCATTG
AAGAAAGGACAGGTGGCAAAATTGGACTTGGAATGCATGGTGCCTGTAAC
GGTCACGAGAACTGCTGCATGACCTGTGATAAAATGAGACATTCGGACCTCA
GCAATGATAAGATCCTATCGCTAGTCCACTGGGGAATGTACAGTGGACATGG
GAAGCTGGAATTTGTATGACCAATTATTTTTTAATCTGAGCTAACTTACTCT
CTGGACTCTTGAAGGCCTTTGGGTTCTGCTGGACAGGAGCACTTTATCTTAA
AAGAAAACTCTCATAAATCATCTTTGAGAAACAAAGGACCTCTGCAACAG
AATCTTGATATTTCTTCTGAAGGATTCCAAAAGTGTCTTATTGCACAGAGTA
AAATACACTCAAATGTATGGTTGCTTTAAAGTTATGAAAGCAAAATTAGAAGT
GTAAACACTGTCACCAGGGTTATCTGAACTGTAGGGAGCTGAGAACTGAGTT
ATTATAATAAACTGTGATGGAAGCTCTATGTTCTGACTTATGTAAGATTTTAA
AATTATTT
```

## **2.24 Clonaje del cDNA del gen *Arid3b* de pollo**

Con el objetivo de realizar ensayos de ganancia de función en el embrión de pollo se llevó a cabo el clonaje del homólogo de *Arid3b* en esta especie. Partimos de la secuencia de la EST de pollo obtenida en la base de datos de ESTs de Manchester. En hibridación *in situ*, la sonda generada a partir de esta EST, proporcionó un patrón de expresión similar al obtenido en ratón. Este dato sugería que podía tratarse de un fragmento del homólogo de *Arid3b* en pollo. En el servidor Ensembl Genome Browser se realizó un blast con la secuencia de nuestra EST frente al genoma del pollo y el resultado con mayor índice de coincidencia fue el siguiente: IDENSGALG00000001376. De acuerdo a la secuencia, a la estructura predicha y a la EST que disponíamos se localizó el inicio y el final de la secuencia codificante. Se diseñaron unos oligos correspondientes a la región 5'UTR (oligo 5') y a la 3'UTR (oligo 3') para amplificar la secuencia candidata por PCR. Los parámetros de la reacción de PCR utilizada para clonar el cDNA del gen *Arid3b* de pollo fueron los siguientes:

Como molde se aisló cDNA de pollo de HH20-22, como polimerasa se utilizó el enzima Expand High Fidelity PCR system, y los siguientes oligos, buffer y programa:

Oligos:

Oligo 5': 5'-CCCATCCTGATAAAGCCAAA-3'

Oligo 3': 5'-GAGGCCAGTGTGAGACAGC-3'

Polimerasa:

High Fidelity (Buffer 2)

Programa de PCR:

94°C	3'		
94°C	30"	}	2 veces
58°C	30"		
72°C	2'		
94°C	30"	}	1 vez
56°C	30"		
72°C	2'		
94°C	30"	}	2 veces
54°C	30"		
72°C	2'		
94°C	30"	}	1 vez
52°C	30"		
72°C	2'		
94°C	30"	}	34 veces
50°C	30"		
72°C	2'		
72°C	5'		
4°C	.....		

El producto de PCR obtenido, el cuál presentaba un tamaño aproximado de 1.8Kb, fue cortado y purificado mediante el kit de extracción de banda de gel de Qiagen. Se llevó a cabo una ligación con el vector pGEM-T easy y una posterior transformación en bacterias termocompetentes XLI-Blue. Se sembraron las bacterias transformadas en placas con ampicilina + Xgal/IPTG y se dejaron crecer durante toda la noche a 37°C. A la mañana siguiente se picaron las colonias blancas, se crecieron y se extrajo el DNA plasmídico mediante el kit de minipreps de Qiagen. Para verificar los clones positivos el DNA de cada uno de ellos fue analizado por enzimas de restricción y fue secuenciado. El resultado fue comparado en bases de datos NCBI.

El siguiente paso fue introducir el segmento clonado en el vector de expresión pCAGGS/SE, plásmido utilizado rutinariamente en experimentos de sobreexpresión. Este vector se caracteriza por poseer, entre otros fragmentos, el promotor de la  $\beta$ -actina de pollo y un *enhancer* del CMV (citomegalovirus). Para realizar el clonaje de los segmentos amplificados se llevó a cabo una nueva PCR con el mismo programa anteriormente descrito. En esta ocasión se utilizó el PGEM-T con la secuencia de



interés como molde y unos oligos que incluían el codón de iniciación 5'-ATG (oligo 5') y el codón de terminación TGA-3' (oligo 3'). Además estos oligos presentaban secuencias de corte específicas que nos permitían introducir el fragmento en el vector pCAGGS/SE (color gris) y una secuencia Kozak (color azul) en el upper primer para favorecer el inicio de la traducción.

Oligos:

Oligo 5': 5'- GCGATATCGCGCCACCATGAAGCTGGAAGCTGTGG-3'

Oligo 3': 5'- TTGCGGCCGCAATCAGAGAGACCAGCTAGTGGAG-3'

Polimerasa:

High Fidelity (Buffer 2)

La banda resultante presentaba un tamaño acorde con el obtenido anteriormente y fue cortada y purificada con el kit de purificación de banda de Qiagen. Posteriormente se digirió EcoRV/NotI y se introdujo en el PCAGGS/SE mediante un protocolo estándar de ligación y transformación. Las bacterias utilizadas fueron de la cepa XLI-Blue y la selección de colonias positivas se realizó por resistencia a Ampicilina. Los clones resultantes fueron verificados por digestión y secuenciación.

## **2.25 Generación de formas dominantes negativas de Arid3b**

Para los ensayos de pérdida de función en embrión de pollo y basándonos en experimentos previos en *Drosophila melanogaster* y ensayos *in vitro*, se generaron dos formas dominantes negativas para el Arid3b de pollo.

Al primero de los mutantes se le denominó **cArid3b<sub>DNHw</sub>** y se basó en el mutante retn/dri<sub>ARID<sup>Δ</sup>H5</sub> (Shandala et al., 2002), cuya unión al DNA se mostró fuertemente afectada al eliminar los aminoácidos WREITKG de la  $\alpha$ -hélice 4 (5 según la nomenclatura otorgada a las  $\alpha$ -hélices en dicha publicación). La actividad dominante negativa de esta molécula se demostró por un aumento en la severidad de los fenotipos de moscas heterocigotas para *Dead ringer/Retained* en las que se sobreexpresa esta construcción. En nuestros ensayos se eliminó la misma secuencia que en la publicación descrita.

A la segunda forma dominante negativa, un mutante puntual, se le llamó **cArid3b<sub>DNy312A</sub>**. Para el diseño de esta construcción nos basamos en el mutante Bright<sub>Y330A</sub> de ratón y en su versión humana Bright<sub>Y324A</sub> (Nixon et al., 2004; Rajaiya et al., 2006). La sustitución de una tirosina por una alanina (aminoácido n°330/324) en la  $\alpha$ -hélice 7, transformaba al factor BRIGHT en una variante dominante negativa del mismo. Esto se demostró en ensayos de movilidad electroforética EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) en células transfectadas con estos mutantes, donde se observó que la presencia de esta construcción impedía la unión de la proteína wt al DNA.

El primer paso en la construcción de estos dominantes negativos consistió en una reacción de PCR con un el enzima Pfu Ultra High Fidelity incluida en un kit especial de mutagénesis dirigida denominado QuickChange Site-directed Mutagenesis y oligonucleótidos que incluían la mutación a generar. El enzima DpnI, endonucleasa específica contra DNA metilado o hemimetilado eliminó los restos de DNA molde.

Oligos cArid3b<sub>D<sup>Nh</sup>W</sub>:

Oligo 5': 5'- AGATCATCAACAAGAAGATCCTTAATCTGCCCCACCTCCAT-3'  
Oligo 3': 5'- ATGGAGGTGGGCAGATTAAGGATCTTCTTGTTGATGATCT-3'

Polimerasa:  
Pfu Ultra High Fidelity DNA polymerase

Oligos cArid3b<sub>D<sup>N</sup>Y312A</sub>:

Oligo 5': 5'- ATATGAAGTACCTATATGCCGCAGAATGCGAGAAGAAATCCCT-3'  
Oligo 3': 5'- AGGGATTTCTTCTCGCATTCTGCGGCATATAGGTACTTCATAT-3'

Polimerasa:  
Pfu Ultra High Fidelity DNA polymerase

Programa PCR:

95°C	30"		
95°C	30"	}	2 veces
55°C	1'		
68°C	10'		

Los productos de PCR fueron cortados y purificados con el kit de extracción de banda de gel de Qiagen. La banda purificada se introdujo en el vector pGEM-T mediante un protocolo estándar de ligación y transformación tal y como se explicó en el punto anterior de esta misma sección. Una vez que colonias positivas fueron verificadas por digestión y secuenciación, se llevó a cabo el clonaje de estas secuencias modificadas en el vector de expresión pCAGGS/SE. Para ello, se realizó una reacción de digestión KpnI/XbaI del vector pGEM-T con los fragmentos de interés y del vector receptor pCAGGS/SE con los enzimas KpnI/NheI. El inserto y el plásmido digeridos se ligaron y el producto de la ligación se transformó en bacterias mediante choque térmico. Las bacterias fueron sembradas en placas de agar con ampicilina. Se analizó el DNA plasmídico del las colonias supervivientes al antibiótico mediante enzimas de restricción y secuenciación. Las secuencias fueron comparadas en bases de datos del NCBI.

## 2.26 Ensayos con Morfolinos

Otro abordaje en los ensayos de pérdida de función fue la electroporación de morfolinos contra el gen *Arid3b* de pollo en embriones de esta especie. Estos análogos de nucleótidos, adquiridos en la compañía Gene-Tools LLC, son capaces de bloquear

el correcto *splicing* del transcrito diana, generando un mRNA maduro aberrante y consecuentemente una proteína no funcional.

En nuestro caso, el sitio de *splicing* diana en el transcrito del gen *Arid3b* de pollo es el situado entre la región 3' del exón 3 y la región 5' del intrón 3:

cDNA *Arid3b* de pollo (Región Exón 3 (negrita) / Intrón 3):  
(Sitio de unión del morfolino subrayado)

**5'-CTTTATGAACTGGATAGTGACCCTGAACGGAAAGAGTTCC**  
**TGGATGACCTCTTCATCTTCATGCAGAAGAGGGGTGAGTGAGCTTTT**  
GTATGAACTCGATACGGTTAAACAGGGATTACTGCTGCAGTTTGAATTCTTG  
CCTCCTGCA-3'

El morfolino antisentido contra el *Arid3b* de pollo que se utilizó en el laboratorio poseía la siguiente secuencia:

5'-CAAAAGCTCACTCACCCCTCTTCTG (conjugado con lisamina)

La empresa Gene-Tools LLC nos administró un morfolino control standard de secuencia:

5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA (conjugado con fluoresceína)

Ambos morfolinos estaba marcados con moléculas fluorescentes, por lo que los embriones electroporados fueron fácilmente analizables mediante la utilización de la lupa de fluorescencia con el filtro RFP/GFP.

## **2.27 Electroporación del ectodermo en la región prospectiva de la extremidad del embrión de pollo**

Para los ensayos de ganancia y pérdida de función en embriones de pollo la técnica utilizada fue la electroporación del ectodermo en la región prospectiva de la extremidad. Los estadios de los embriones electroporados varían entre 8HH y 14HH, siendo 10-11HH la etapa embrionaria en la que se obtuvieron resultados óptimos.

### **Condiciones de la electroporación:**

Número de pulsos: 5  
Longitud de pulsos: 50ms  
Espacio entre pulsos: 450ms  
Voltaje: 10V

### **Electrodos:**

Debido a los pobres resultados obtenidos con los electrodos comerciales, los electrodos utilizados fueron construidos en el servicio de instrumentación del CNB y del CNIC con las siguientes características:

Material: Platino

Diámetro de cada electrodo: 0,3mm

Separación entre electrodo superior e inferior: 1.5mm

### **Mezcla de electroporación:**

Los vectores de interés fueron co-electroporados con el mismo vector unido a GFP, de esta manera se logró monitorizar las células electroporadas.

Para evitar la rápida difusión de la mezcla de electroporación una vez aplicada la muestra sobre el embrión, se añadió carboximetilcelulosa, la cual proporcionó la densidad y consistencia necesaria. Finalmente la composición de la mezcla quedó así determinada:

Plásmido de interés: 1-2 $\mu$ g/ $\mu$ l

Plásmido con GFP (PCAGGS/GFP): 0,1-0,2 $\mu$ g/ $\mu$ l

Fast green: 0,1%

Carboximetilcelulosa: 1%

(Todo diluido en agua)

En el caso de los morfolinós, éstos fueron electroporados a una concentración de 0,5mM diluidos en PBS.

### **Procedimiento:**

Una vez realizada la apertura del huevo se retiraron 2-3ml de albúmina y se añadieron unas gotas de PBS al embrión. Se retiró con una aguja de tungsteno la membrana vitelina de la zona a electroporar y se añadieron 0.5 ml de la mezcla de electroporación. A continuación los electrodos fueron colocados flanqueando al embrión por la parte superior (electrodo negativo) e inferior (electrodo positivo). Se aplicaron los pulsos, se retiraron los electrodos y se añadieron un par de gotas de PBS, tras lo cual se taparon la apertura con papel celo y se volvieron a incubar hasta que alcanzaron el estadio deseado. En cuanto a la metodología de esta técnica resulta importante destacar, que en todos estos ensayos se electroporó en la región derecha del embrión quedando la izquierda como control.

## **2.28 Inducción de primordios de extremidad ectópicas en embriones de pollo mediante la colocación de microesferas impregnadas de FGF8 recombinante**

Para la realización de este experimento se utilizaron embriones de pollo de estadios comprendidos entre 14HH y 16HH. Se incubaron microesferas acrílicas recubiertas de heparina durante 1 hora en FGF8 recombinante 1mg/ml en PBS + 0,1% BSA. Tras la apertura del huevo, se añadieron un par de gotas de PBS al embrión y se retiró la membrana vitelina con una aguja de tungsteno. En el mesodermo lateral del embrión, a la altura de los somitos 20-22, se realizó una incisión y se colocó la microesfera. Los embriones manipulados fueron recogidos a las 20 horas y se fijaron en PFA4%.

### **2.29 Manipulación de la cresta ectodérmica apical mediante colocación de microesferas impregnadas en FGF10, SU5402.**

En este ensayo, los embriones de pollo utilizados presentaban un estadio de desarrollo comprendido entre 19HH y 20HH. Las microesferas se incubaron durante 1 hora en la sustancia correspondiente a las concentraciones especificadas en la tabla 3.

<b>Tabla 3: Manipulación del AER con microesferas impregnadas</b>			
<b>Sustancia</b>	<b>Tipo de microesfera</b>	<b>Concentración</b>	<b>Tiempo de recogida</b>
SU5402	AGI-X2	2mg/ml	24 horas
FGF10	Acrílica recubierta de heparina	1mg/ml	6-10 horas

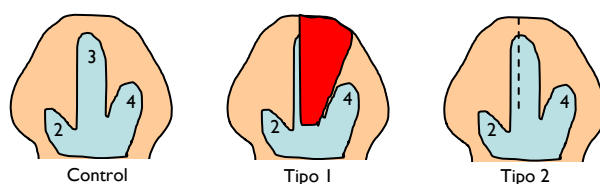
En primer lugar se realizó una apertura en el huevo y se eliminaron tanto la membrana vitelina como la amniótica del primordio de la extremidad que se fue a manipular. Con una aguja de tungsteno se llevó a cabo una incisión inmediatamente debajo del AER. En el caso de las microesferas con FGF10, la herida se realizó en la parte anterior del primordio, mientras que en el caso de las impregnadas con SU5402, ésta se llevó a cabo en la región central. La microesfera fue colocada en la herida, se añadieron unas gotas de PBS y se cerró el huevo. Se recogió a diferentes tiempos según la sustancia.

### **2.30 Manipulación de la expresión de Bambi en el interdígito mediante la colocación de bolas impregnadas en NOGGINA**

Para realizar este experimento se utilizaron embriones de estadios 26-27HH. Antes de su implantación, las microesferas (acrílica recubierta de heparina) se incubaron durante 1 hora en NOGGINA 1mg/ml. Se abrió el huevo y se rasgó la membrana amniótica a la altura de la extremidad inferior. Posteriormente se realizó una incisión en el interdígito 3 de la extremidad inferior derecha y se colocó la microesfera impregnada con NOGGINA. Se añadieron unas gotas de PBS y se tapó el huevo con cinta adhesiva. Recogimos a las 24 horas.

### **2.31 Manipulación de la identidad de los dígitos de la extremidad superior de pollo**

Con el objetivo de transformar la identidad del dedo 3 del ala del pollo y basándonos en publicaciones previas (Dahn and Fallon, 2000), se llevaron a cabo dos tipos de manipulaciones en embriones de esta especie (Fig. 28).



**Figura 28:** Resumen de los experimentos de manipulación de la identidad del dedo 3 en el ala del pollo.

En los ensayos tipo 1 se eliminó la parte posterior del dedo 3 junto con el interdígito 3 en alas de estadio 28-29 HH. La fracción de dedo 3 eliminada resultó variable, entre un 60-90%, siendo los resultados óptimos cuando esta región superaba el 80%.

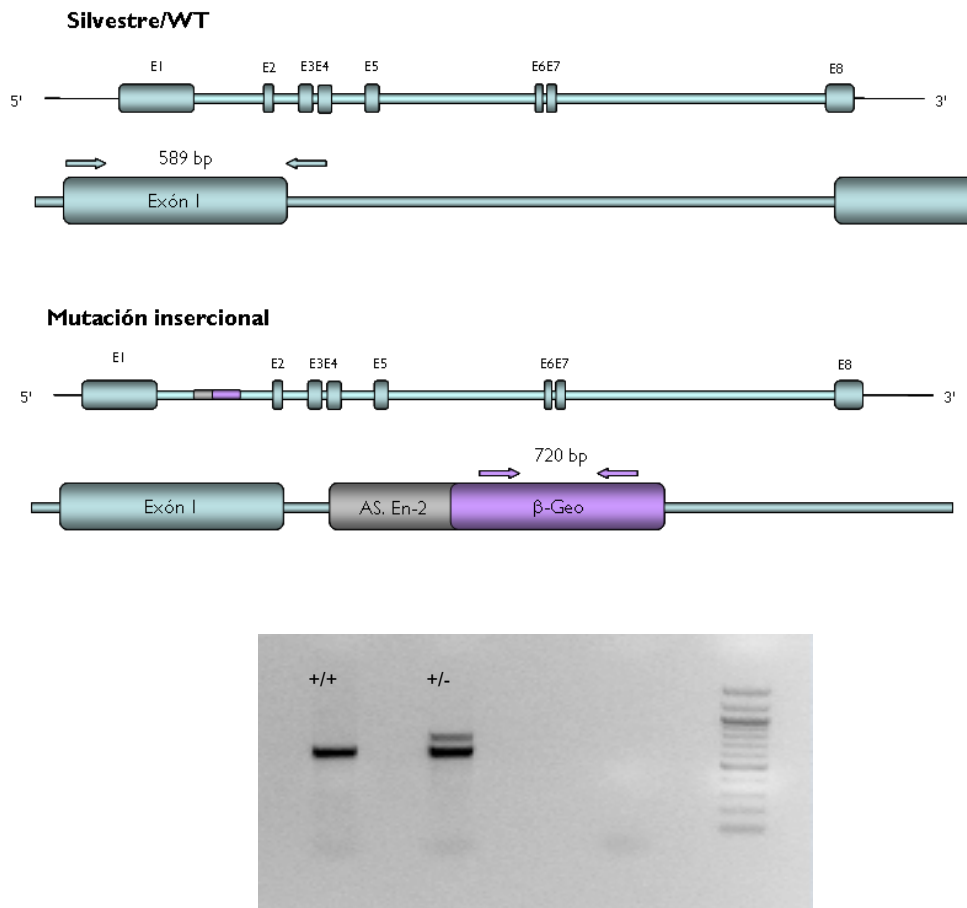
En los ensayos tipo 2 se realizó una bisección del dedo 3, separando la región anterior del dígito de la posterior en alas de estadio 27-29HH. Esta bisección fue realizada a diferentes niveles antero-posteriores en la que se separaba un mayor o menor porcentaje de la región posterior. Se obtuvieron los mejores resultados en cortes que separaban al menos un 80% de la parte posterior en alas de estadio 27HH.

Para estas operaciones se utilizaron agujas de tungsteno y microtijeras. Los especímenes manipulados se dejaron crecer 7 días más, haciendo un total de 12-13 días y se recogieron. Se analizaron a la lupa y se fijaron en PFA 4% durante toda la noche. Posteriormente se procesaron para llevar a cabo una hibridación *in situ* en muestras enteras.

### **2.32 Generación del ratón mutante de pérdida de función CDI.129P2Arid3b<sup>Gt(RRJ028)Byg</sup>. Genotipado.**

Para llevar a cabo ensayos de pérdida de función en el embrión de ratón se adquirió en la empresa Bay Genomics (Stryke et al., 2003) una línea de células madre embrionarias murinas de nominadas RRJ028, que presentaban una mutación insercional (*gene-trap*) en el locus de *Arid3b*. Estas células provenían de la cepa de ratón 129/Ola y tanto la construcción empleada como la localización dentro del locus de *Arid3b* se detallan en la figura 29.

Estas células modificadas genéticamente fueron utilizadas para la generación de los ratones quimeras mediante el sistema de agregación de mórulas y posterior transferencia a hembra pseudogestante. Algunas de las quimeras obtenidas fueron capaces de transmitir, a parte de su descendencia, la modificación genética y se obtuvieron los primeros ratones heterocigóticos para el alelo mutado (CDI.129P2Arid3b<sup>Gt(RRJ028)Byg</sup> /<sup>+</sup>).



**Figura 29:** Esquema que representa el locus de *Arid3b* en ratones wt y en ratones heterocigotos  $CD1.129P2Arid3b^{Gt(RRJ028)Byg/+}$ . La mutación insercional (*gene-trap*), formada por el aceptor de *splicing* de *Engrailed2* junto con un *cassette*  $\beta$ -Geo, se localiza en algún punto del Intrón<sub>1</sub>. Las flechas representan los oligos empleados para el genotipado por PCR y el número adyacente el tamaño del fragmento amplificado mediante esta técnica. Gel de Agarosa en la que se evidencia el resultado de una PCR utilizada para el genotipado de ratones wt y mutantes heterocigotos.

El genotipado de los ratones se realizó mediante PCR y la utilización de primer específicos tal y como se indica en la figura anterior.

Banda WT:

Oligo 5': 5'-CAGCAGAAGCAGCCACAGCAG-3'

Oligo 3': 5'-AGTTCGCACCCATCCTACACC-3'

Tamaño de banda: 589 pb.

Banda Heterocigoto:

Oligo 5': 5'-ACTATCCCGACCGCCTTACT-3'

Oligo 3': 5'-ATACTTTCTCGGCAGGAGCA-3'

Tamaño de banda: 720 pb.

Programa PCR:

94°C	3':30"	}	30 veces
94°C	30"		
60°C	30"		
72°C	2':30"		
72°C	5'		
4°C	.....		

Actualmente desconocemos la localización exacta de la inserción mutacional dentro del intrón I por lo que, por el momento, nos ha resultado imposible genotipar los ratones mutantes homocigóticos  $CD1.129P2Arid3b^{Gt(RR)028)Byg/Gt(RR)028)Byg}$  mediante técnicas convencionales como la PCR. Es por eso se puso a punto un protocolo de genotipado por tinción con X-gal que será descrito en el apartado resultados.

A lo largo de esta tesis doctoral nos vamos a referir a los ratones mutantes heterocigotos  $CD1.129P2Arid3b^{Gt(RR)028)Byg/+}$  y a los ratones mutantes homocigotos  $CD1.129P2Arid3b^{Gt(RR)028)Byg/Gt(RR)028)Byg}$ , como  $Arid3b^{+/-}$  y como  $Arid3b^{-/-}$  respectivamente.

### **2.33 Análisis de expresión diferencial: Microarrays en primordios de la extremidad de embriones de pollo**

En nuestro intento por encontrar qué genes estaban regulados por *Arid3b* en la extremidad se realizó un experimento de *microarrays* en embriones de pollo electroporados, en el que comparamos especímenes que sobreexpresaban diferentes construcciones. Para ello electroporamos el ectodermo prospectivo de la extremidad y recogimos los ejemplares con altos niveles de GFP a las 30 horas postelectroporación, momento en el que todavía no se observa un fenotipo obvio con ninguna de las construcciones empleadas. Posteriormente aislamos sus primordios electroporados y se procesaron para extraer su RNA mediante el kit Absolutely RNA de Stratagene. Los embriones a comparar se englobaron en tres grupos diferentes, aquellos que sobreexpresaban la forma silvestre de *Arid3b*, los que sobreexpresaban la forma dominante negativa  $cArid3b_{DNHW}$  y, por último, aquellos que han sido electroporados con el plásmido vacío. Se tomaron tres muestras de cada condición, compuestas cada una por un número cercano a 10 primordios electroporados. Una vez extraído el RNA, se precipitó con la ayuda de acrilamida lineal y se cuantificó en el Nanodrop así como se estableció su grado de pureza e integridad mediante un gel libre de RNasas.

A continuación las muestras procesadas se trasladaron al servicio de Genómica del CNIC donde fueron analizadas y se cargaron en el chip. La plataforma utilizada fue el chip específico de pollo de la casa comercial Agilent Technologies que engloba alrededor de 40.000 genes y transcritos

### **2.34 Análisis de expresión diferencial: Microarrays en embriones de ratón**

Con el objetivo de encontrar genes cuya expresión estuviese controlada por *Arid3b* se llevó a cabo un ensayo de expresión diferencial mediante *microarrays*. En este



experimento se trataba de comparar genes diferencialmente expresados en embriones silvestres frente a embriones mutantes *Arid3b*<sup>-/-</sup>, en dos fases de desarrollo distintas entre 5 y 14 somitos (E8.5) y entre 15 y 21 somitos (E9). A estadio E8.5 los embriones mutantes de falta de función *Arid3b*<sup>-/-</sup> no muestran ningún tipo de fenotipo por lo que nos pareció interesante analizar las vías diferencialmente expresadas antes de evidenciar ninguna anomalía. Además se pensó incluir un segundo punto, a E9 donde el fenotipo comenzaba a ser detectable. Se extrajeron embriones de los citados estadios y se realizaron diferentes muestras, mezclando distintos embriones agrupados por número de somitos. A estadio E8.5 se obtuvieron seis muestras pareadas (6 silvestres a comparar con 6 *Arid3b*<sup>-/-</sup>) constituidas por cuatro embriones cada una, mientras que a estadio E9 analizamos cuatro muestras pareadas formadas también a partir de cuatro embriones, a excepción de la muestra 9.2 y 9.4 que contienen tres. Los ejemplares seleccionados en cada muestra presentaban un número de somitos similar al de la muestra con la que se iba a aparear. La distribución de los especímenes seleccionados así como, su número de somitos aparecen resumidos en la tabla 4.

De las diferentes muestras se extrajo el RNA utilizando el kit Absolutely RNA de Stratagene y se precipitó en presencia de acrilamida lineal. Posteriormente se midió la concentración en el Nanodrop y se determinó su grado de pureza e integridad mediante un gel libre de RNasas.

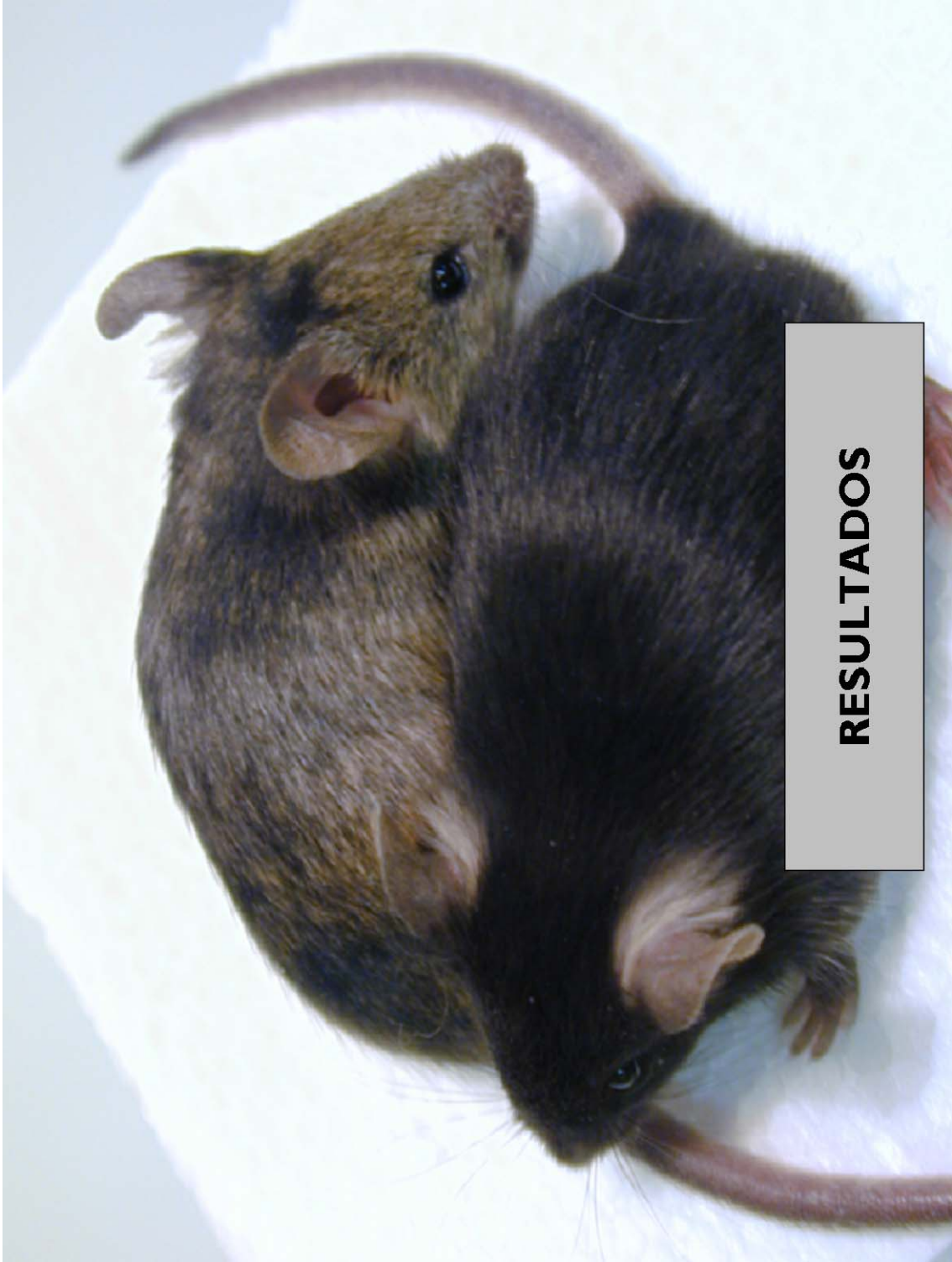
Las muestras se enviaron al servicio de Genómica de CNIC donde se realizó el propio experimento. El soporte que se utilizó fue el conocido como Whole Mouse Genome Microarrays de la casa comercial Agilent Technologies en el cual están representados más de 41.000 genes y transcritos.

Tabla 4: Microarrays en embriones de ratón													
Estado E8.5	Nº somitos	Muestra 8.5.1 Arid3b <sup>-/-</sup>				Muestra 8.5.2 Arid3b <sup>-/-</sup>				Muestra 8.5.3 Arid3b <sup>-/-</sup>			
		7				7-8				6-7			
		7				9-10				9			
		10				11-12				11			
	Nº somitos	10-11				14				12			
		10				11-12				10			
		10-11				11				11			
		10-11				11				11			
	Nº somitos	10-11				14				12			
		10-11				11-12				10			
10-11				11				11					
10-11				11				11					
Estado E9	Nº somitos	Muestra 9.1 WT			Muestra 9.2 WT			Muestra 9.3 WT			Muestra 9.4 WT		
		16			21			20			20-21		
		17			16			15			15		
	Nº somitos	19			20			16-17			20-21		
		19			20			19-20			16		
		19			20			19-20			20-21		
	Nº somitos	21			16			15			15		
		18			20			17			16		
		20			20			19			20-21		
	Nº somitos	21			15			17			15-16		
15			15			19			17				
17			19			21			20				
Nº somitos	15-16			17			20			20			
	17			20			21			20			
	20			20			21			20			

Tabla 4: Datos concernientes a los embriones utilizados para el ensayo de expresión diferencial mediante *microarrays*. Se especifica el nº de somitos de cada embrión empleado en cada muestra.

Tabla 4: Datos concernientes a los embriones utilizados para el ensayo de expresión diferencial mediante *microarrays*. Se especifica el nº de somitos de cada embrión empleado en cada muestra.







# **RESULTADOS**

## **I. Proyecto de Genómica: Arid3b en la extremidad de vertebrado**

### **I.1. Screening de expresión en el embrión de ratón: De la mosca a vertebrados**

Con el propósito de encontrar nuevos genes implicados en la formación de patrón en la extremidad de vertebrado, se realizó un *screening* de expresión en embriones de ratón basado en secuencias de *Drosophila melanogaster* cuya mutación provocaba fenotipo en la formación del ala. Numerosos trabajos han demostrado un alto grado de conservación entre el desarrollo de los apéndices en *Drosophila* y la formación de la extremidad de vertebrado (Morata, 2001). Por este motivo, nuestra hipótesis de partida se basaba en que, si un gen se encontraba implicado en el desarrollo del ala de la mosca, era posible que su homólogo en ratón pudiera ser determinante en la formación de sus extremidades. A continuación, de los genes de mosca candidatos, se buscaron secuencias homólogas en ratón y se diseñaron sondas de RNA específicas para estos genes. Posteriormente se realizaron hibridaciones *in situ* en embriones de ratón a diferentes fases de desarrollo. Habiendo analizado alrededor de 50 genes se determinó que uno de los que presentaba un patrón de expresión más interesante fue *Dril2/Arid3b/Bdp*. Este gen es uno de los homólogos en ratón del gen de *Drosophila melanogaster* *Dead ringer/Retained*.

### **I.2. Análisis del patrón de expresión del gen Arid3b en el embrión de ratón y pollo**

#### **I.2.1. Patrón de expresión de Arid3b en el embrión de ratón**

Se llevó a cabo un análisis detallado del patrón de expresión de *Arid3b* en embriones de ratón a diferentes estadios. Para ello se utilizaron hibridaciones *in situ* en embriones enteros, hibridaciones *in situ* en secciones de criostato y parafina, así como tinciones lac-Z en embriones heterocigotos *Arid3b<sup>+/-</sup>*. Recordemos que esta cepa de ratón mutante proviene de células ES murinas con el gen reportero de la  $\beta$ -galactosidasa en el locus de *Arid3b*, lo que nos permite desvelar el patrón de expresión de este factor de transcripción mediante una tinción lac-Z.

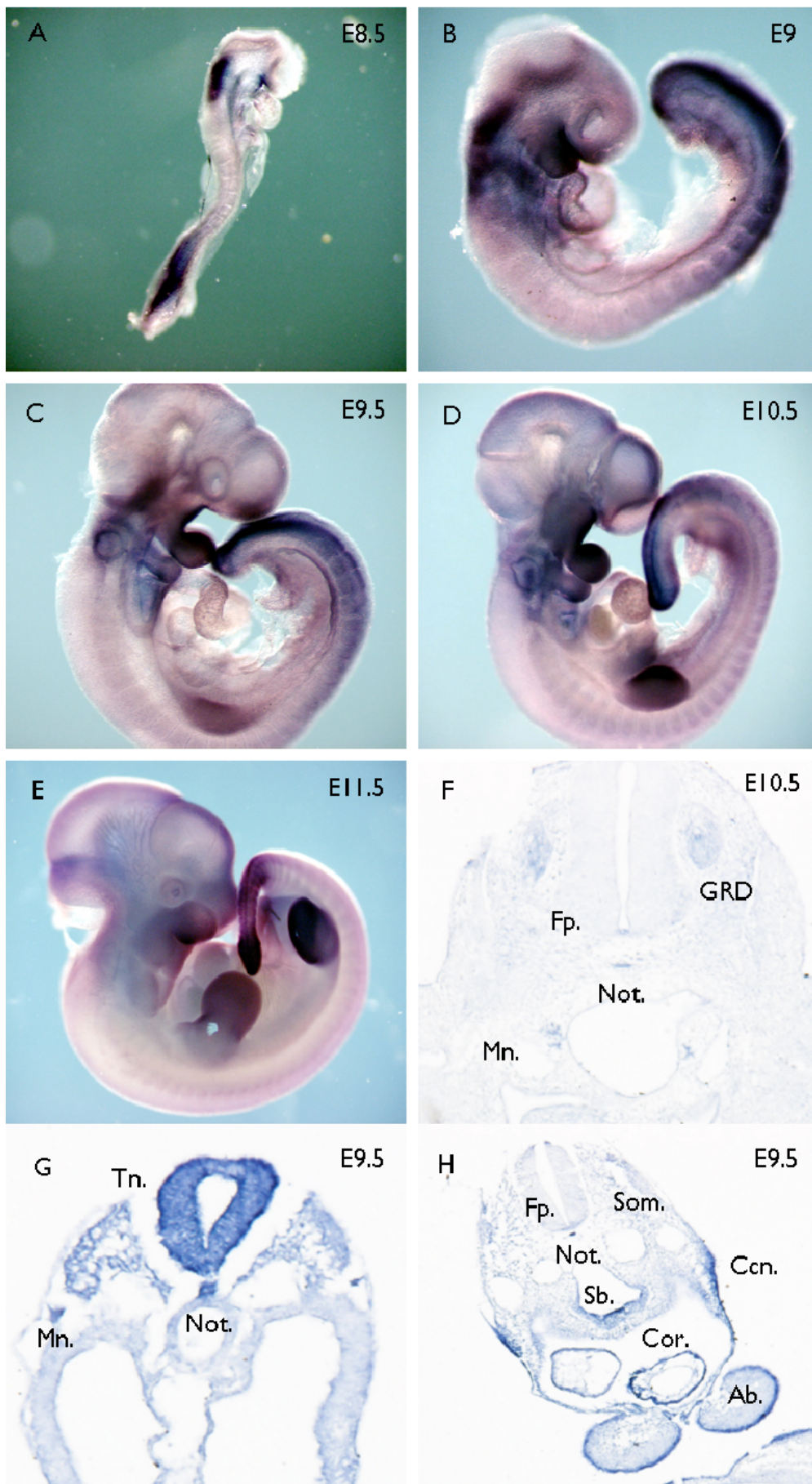
La expresión del gen *Arid3b* en los diferentes embriones analizados no presentaba un patrón ubicuo si no más bien altamente órgano-específico. Por otro lado este patrón de expresión mostró un alto grado de dinamismo en las distintas etapas de desarrollo analizadas. A continuación se describirá en detalle el patrón de expresión de *Arid3b* en las diferentes estructuras del embrión de ratón. El patrón de expresión en el primordio de la extremidad será analizado en detalle en el siguiente apartado.

En embriones de E8.5 se detectó señal de *Arid3b* mayoritariamente distribuida en dos regiones, una anterior y otra posterior. En la primera, el patrón de expresión se restringía al romboencéfalo preótico, a algunas células de la cresta neural, a los sacos y arcos branquiales, al tubo cardiaco y a la parte anterior del tubo digestivo. En la segunda, la expresión de este gen se localizaba de manera muy intensa en el mesodermo caudal así como en la totalidad del tubo neural.

La expresión de *Arid3b* en embriones de E9.5 apareció, de nuevo, principalmente restringida a una región posterior y a una anterior del espécimen. Las estructuras rostrales que mayores niveles de *Arid3b* exhibían fueron el romboencéfalo, la vesícula ótica, células de la cresta neural craneal, los arcos y sacos branquiales, la parte anterior del tubo digestivo, especialmente en faringe y estómago, más posteriormente a una estructura que podría corresponder al hígado, así como en el corazón. En la zona caudal se pudo destacar una intensa expresión de este factor en el tubo neural completo y en el mesodermo posterior. Aunque el patrón de *Arid3b* se defina mayoritariamente en dos grandes territorios del embrión se pudo determinar una fuerte expresión de este gen en estructuras posicionadas a lo largo del eje antero-posterior (rostro-caudal). Entre ellas, cabe destacar la notocorda, dermomiótomo, mesonefros y floorplate (región más ventral del tubo neural). Como podemos evidenciar, la señal detectada en el tubo neural varía a medida que nos desplazamos por el eje. Mientras a lo largo del tubo neural la expresión de *Arid3b* se ubica en la parte ventral de éste, en la región caudal se extiende a su totalidad. La expresión de este gen en esta etapa embrionaria se confirmó mediante la utilización de técnicas de tomografía óptica (OPT) (Figura suplementaria I).

En embriones de E10.5 el patrón de expresión de *Arid3b* presentaba altas similitudes con el observado a estadio E9.5 y de manera persistente, abarcaba dos grandes áreas. El primero de estos territorios, localizado en la región anterior, englobaba a la vesícula ótica, las placodas olfatorias, algunas células de la cresta neural, ganglios de las raíces dorsales, arcos y sacos branquiales, faringe, esófago y estómago y corazón. El segundo territorio, ubicado en la región posterior, correspondía a la zona dorsal del mesodermo caudal y al tubo neural. Además, se evidenció expresión de *Arid3b* en la notocorda y mesonefros a lo largo del eje rostro-caudal. La señal de este gen en el tubo neural es similar a lo evidenciado a estadio E9.5 con expresión en el floorplate en las regiones más anteriores del tronco y en todo el territorio del tubo neural en regiones más posteriores. De manera parecida, la expresión en el dermomiótomo exhibe un patrón bastante dinámico con expresión más intensa en somitos más inmaduros. A medida que estas estructuras alcanzan cierto nivel de maduración la expresión de *Arid3b* va decayendo.

**Figura 30:** A-E) Hibridaciones *in situ* en embriones de ratón de diferentes estadios con la sonda de *Arid3b*. Este gen se expresa en numerosas estructuras durante su desarrollo. F) Sección de un embrión de ratón de estadio E10.5 mostrando la expresión de *Arid3b* en los ganglios de las raíces dorsales (GDR.), floorplate (Fp.), mesonefros (Mn.) y notocorda (Not.). G) A E9.5 *Arid3b* se detecta en los mesonefros (Mn.), notocorda (Not.) y totalidad del tubo neural (Tn.) en niveles posteriores. H) En niveles anteriores se observan altos niveles de *Arid3b* en los arcos branquiales (Ab.), células de la cresta neural (Ccn.), corazón (Cor.), floorplate (Fp.), notocorda (Not.), sacos branquiales (Sb.) y somitos (Som.).





En embriones de E11.5 la intensidad de la señal detectada mediante hibridación *in situ* en especímenes enteros disminuyó considerablemente por lo que las técnicas empleadas para el análisis del patrón de expresión en estos estadios fueron la hibridación *in situ* en secciones tanto de parafina como de criostato así como la tinción lac-Z de embriones *Arid3b*<sup>+/-</sup>. Las estructuras que mayor expresión de *Arid3b* presentaron fueron la placa olfatoria, ganglios de las raíces dorsales, los arcos branquiales, parte anterior del tubo digestivo, miocardio, dermomiótomo, hígado, notocorda, floorplate y mesodermo dorsal de la punta de la cola.

En estadios posteriores, E12.5-E13.5, se observó un severo descenso en los niveles de expresión de *Arid3b* en la mayoría las estructuras antes citadas. No obstante se detectó una fuerte expresión en estructuras como el cristalino, los ganglios de las raíces dorsales, orificios nasales, corazón, punta de la cola, así como en el tubérculo genital.

El patrón de *Arid3b* analizado a diferentes estadios sugiere un posible papel de este gen en el desarrollo de diferentes órganos durante la embriogénesis. No obstante, y aunque nuestro interés en la formación de la extremidad de vertebrado nos ha centrado en el estudio de *Arid3b* en esta estructura, describiremos el patrón de este factor de transcripción en el corazón en desarrollo.

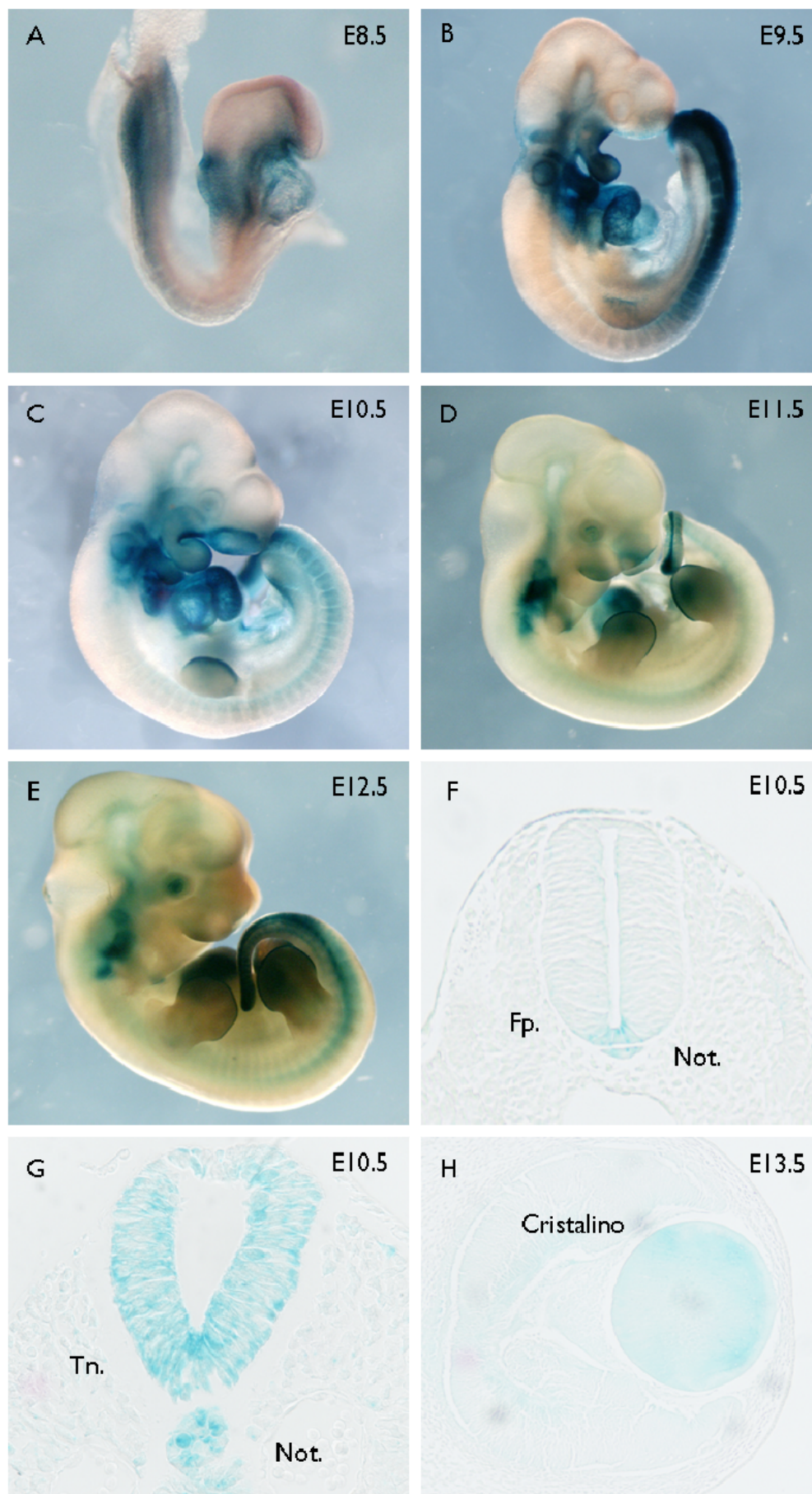
### **1.2.2. Patrón de expresión de *Arid3b* en el corazón del embrión de ratón**

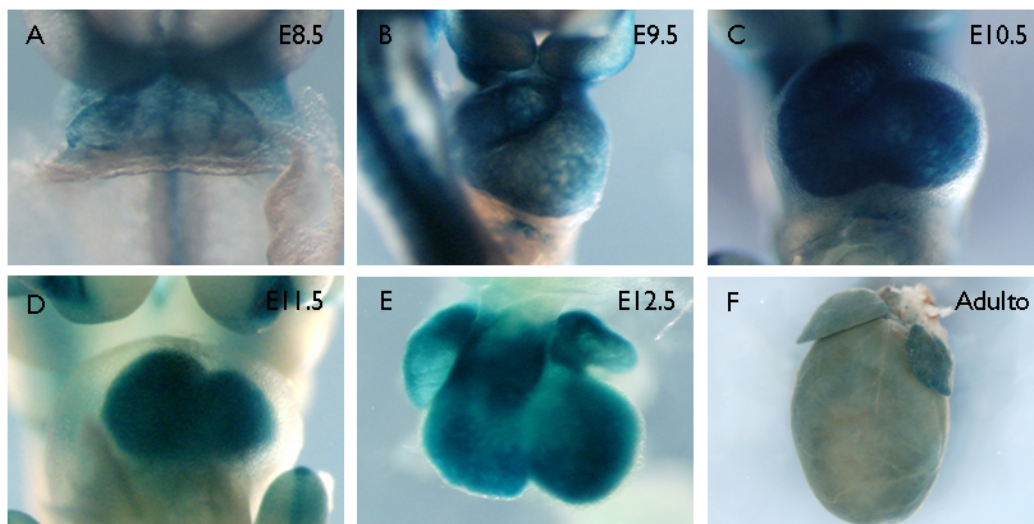
Durante el análisis del patrón de *Arid3b* en el corazón en formación se detectaron evidentes diferencias según la metodología empleada.

En especímenes de estadio E8.5, técnicas de hibridación *in situ* delimitaron la expresión de *Arid3b* a la región rostral del tubo cardiaco. Curiosamente, el empleo de otro método, como es la tinción lac-Z, reveló expresión de este gen en la totalidad del primordio de corazón (Fig. 32).

A E9.5, con la utilización de la hibridación *in situ*, tanto en espécimen entero, como en secciones, la expresión se observó en el tracto de salida, así como en el miocardio de la aurícula en desarrollo. Sin embargo, tinciones lac-Z en embriones heterocigotos *Arid3b*<sup>+/-</sup>, a la señal detectada anteriormente, se le sumó la mostrada por el miocardio del ventrículo.

**Figura 31:** A-E) Tinciones Lac-Z en embriones de ratón *Arid3b*<sup>+/-</sup>, a diferentes etapas de desarrollo, muestran el patrón de expresión de *Arid3b*. Este patrón es muy dinámico y altamente órgano-específico. F-G) Secciones transversales de embriones de E10.5 teñidos con Lac-Z a diferentes niveles del tubo neural. F) En la región anterior *Arid3b* se expresa claramente en el floorplate (Fp.) y en la notocorda (Not.) G) En secciones localizadas en regiones posteriores la expresión se observa, además de en la notocorda (Not.), en la totalidad del tubo neural (Tn.). H) Expresión de *Arid3b* en el cristalino de embriones de ratón a estadio E13.5.



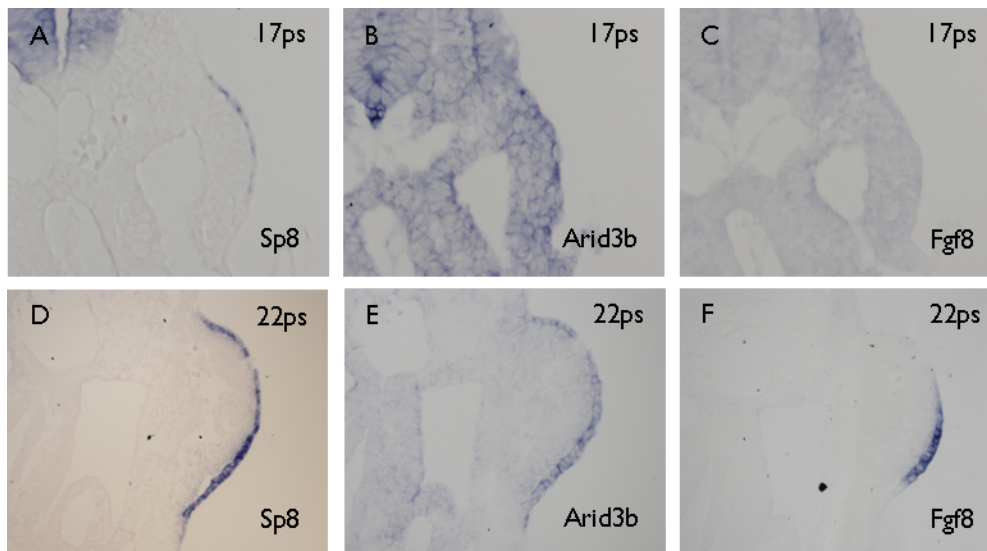


**Figura 32:** A-E) Expresión de *Arid3b* revelada mediante tinción lac-Z en el corazón de embriones heterocigotos *Arid3b*<sup>+/-</sup> a diferentes estadios de desarrollo. F) Tinción lac-Z en el corazón de un ratón heterocigoto adulto.

En estadios posteriores, de manera perseverante, se observó expresión de *Arid3b* en el miocardio de todo el corazón, únicamente, mediante la tinción lac-Z. Esta expresión se mantuvo en todas las etapas embrionarias estudiadas, siendo E13.5 el último estadio analizado. Curiosamente, tinciones lac-Z en corazones pertenecientes a ratones *Arid3b*<sup>+/-</sup> adultos, revelaron una fuerte expresión de este factor en todo el miocardio, especialmente intensa en la aurícula izquierda.

### **1.2.3. Patrón de expresión de *Arid3b* en el primordio de la extremidad del embrión de ratón**

La expresión de *Arid3b* en el ectodermo del primordio prospectivo comienza a ser detectable a estadios 9-9.25 (17 pares de somitos). En embriones de estos estadios se llevó a cabo una hibridación *in situ* en secciones consecutivas con las sondas de *Sp8*, *Arid3b* y *Fgf8* para determinar el orden de aparición de estas moléculas. El gen *Sp8* codifica para un factor de transcripción encargado de la inducción del primordio de la extremidad y se expresa en el ectodermo de esta estructura momentos antes de su aparición (Bell et al., 2003; Kawakami et al., 2004; Treichel et al., 2003). *Fgf8* a su vez es un marcador de la cresta ectodérmica apical y su expresión es más tardía, aproximadamente a E9.25 (18 pares de somitos) (Crossley and Martin, 1995; Mariani et al., 2008). Los especímenes analizados, mostraron fuertes niveles de *Sp8* en el ectodermo del primordio prospectivo, mientras que no se pudo detectar ningún tipo de señal en las secciones hibridadas con la sonda de *Fgf8*. Por su parte, *Arid3b* empezaba a expresarse claramente en el ectodermo (Fig. 33).



**Figura 33:** A-C) Hibridación *in situ* en secciones consecutivas de embriones de ratón de 17 pares de somitos con las sondas de *Sp8*, *Arid3b* y *Fgf8*. *Sp8* y *Arid3b* se observa claramente en el ectodermo del primordio a esta etapa embrionaria mientras que *Fgf8* resulta indetectable. D-F) En secciones consecutivas a estadios posteriores, 22 pares de somitos, los tres genes ya se expresan de forma evidente en el ectodermo del primordio.

En idénticos experimentos realizados en embriones más avanzados, E9.25 (22 pares de somitos), se advirtió expresión de *Sp8*, *Fgf8* y *Arid3b* en el ectodermo del primordio de forma evidente. Este resultado demostró que en el embrión de ratón, *Arid3b* se expresaba antes que *Fgf8* durante el desarrollo de la extremidad (Fig. 33).

Estudios en etapas posteriores revelaron que a estadio E9.5, momentos después de la inducción del primordio de la extremidad, *Arid3b* se expresaba en la totalidad del ectodermo que constituye y envuelve esta estructura. Este patrón se observó tanto por hibridación *in situ* como por tinción lac-Z en embriones heterocigotos (Fig. 34).

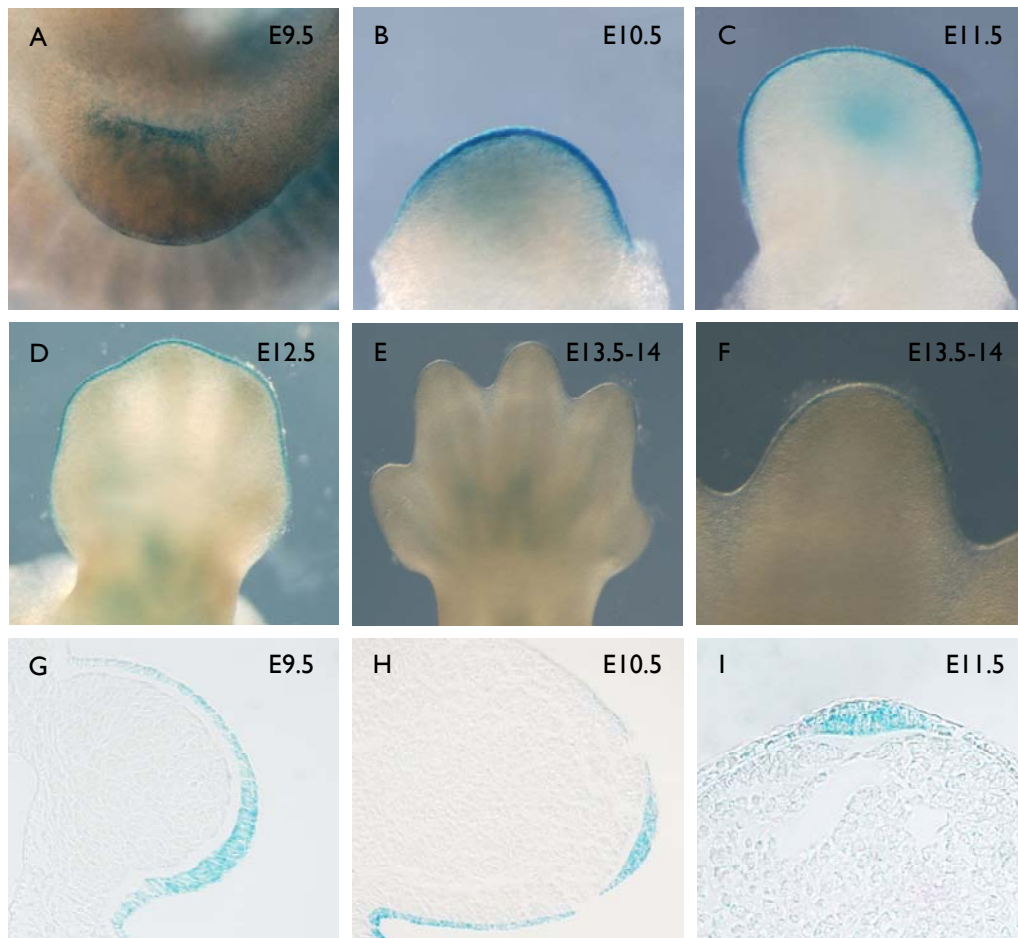
A estadios más avanzados, E10.5, *Arid3b* comienza a desaparecer del ectodermo dorsal quedando delimitado al ectodermo ventral y al AER (Fig. 34).

Posteriormente, a E11.5, *Arid3b* delimitaba su patrón a la parte distal del ectodermo del primordio de la extremidad y parecía incrementarse en la cresta ectodérmica apical (AER) (Fig. 34). La utilización de tinciones lac-Z en embriones heterocigotos determinó que dicha expresión de *Arid3b* en esta región y en este estadio, correspondía de una manera muy específica al AER. La señal se mantiene en esta estructura a lo largo del desarrollo de la extremidad hasta que a estadio E13.5-14 se atenúa coincidiendo con la desaparición de la propia cresta ectodérmica apical, quedando vestigios en el ectodermo distal de los dígitos (Fig. 34).

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron un patrón de expresión de *Arid3b* muy dinámico en el ectodermo de la extremidad en desarrollo. En un primer lugar se inicia en todo el ectodermo para restringirse, en una etapa intermedia, al ectodermo



ventral y finalmente localizarse en la cresta ectodérmica apical. Esta expresión sugiere una potencial implicación de este gen en el desarrollo de la extremidad, y en particular en la formación del AER.



**Figura 34:** A-F) Expresión de *Arid3b* en la extremidad de embriones *Arid3b*<sup>+/-</sup> revelada mediante la utilización de tinciones lac-Z en especímenes enteros. G-I) Secciones de estos embriones determinaron que, en etapas tempranas (E9.5), *Arid3b* se expresa en todo el ectodermo del primordio. Más tarde, a estadio E10.5, desaparece del ectodermo dorsal y finalmente se restringe a la cresta ectodérmica apical (AER).

#### **1.2.4. Patrón de expresión de *Arid3b* en el embrión de pollo**

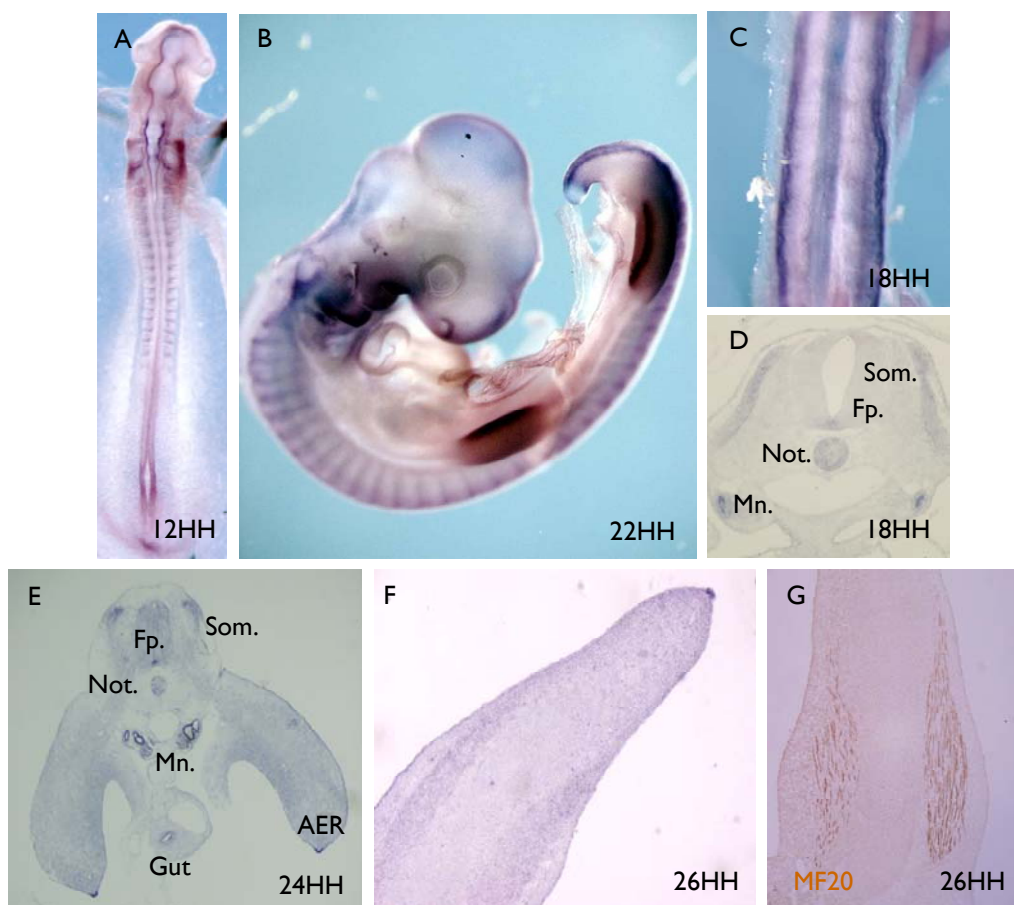
Para el análisis del patrón de expresión del homólogo del gen *Arid3b* en el embrión de pollo se utilizó una sonda específica para esta especie y se realizaron hibridaciones *in situ* en especímenes enteros y en secciones, tanto de criostato como de parafina. La sonda utilizada se sintetizó a partir de una EST encontrada en la base de datos de ESTs de pollo de Manchester, que mostraba una altísima homología con la secuencia murina, tal y como se detalla en el apartado Materiales y Métodos.

A grandes rasgos se pudo determinar que el patrón de expresión del gen *Arid3b* en esta especie presentaba un alto grado de homología con respecto al ratón. Al igual que

en su homólogo murino, se observó una expresión dinámica y órgano-específica a lo largo de los diferentes estadios estudiados. La expresión de este gen en el primordio de la extremidad del embrión de pollo será analizada posteriormente.

En embriones de 12HH, el patrón de expresión se restringía al romboencéfalo, algunas células de la cresta neural craneal, floorplate, notocorda, parte anterior del tubo digestivo, dermomiótomo, mesonefros y, en la región posterior, a la totalidad del tubo neural (Fig. 35).

A estadios más tardíos, 18-22HH, la expresión de *Arid3b* se detectó en células de la cresta neural, floorplate, notocorda, faringe, estómago, mesonefros, dermomiótomo y todo el tubo neural de la región más posterior (cola). Por otro lado se pudo observar en los arcos y sacos branquiales (Fig. 35).



**Figura 35:** Hibridaciones *in situ* en embriones de pollo de diferentes estadios con la sonda de *Arid3b*. El patrón de expresión es similar al detectado en el embrión de ratón. C) Expresión de *Arid3b* en los mesonefros de embriones de estadio 18HH. D y E) Hibridación *in situ* en secciones transversales de embriones a diferentes estadios. F y G) Secciones consecutivas, tratadas para hibridación *in situ* con la sonda de *Arid3b* y para ensayos inmunohistoquímicos con el anticuerpo anti-MF20, que confirman la expresión de *Arid3b* en el músculo de la extremidad. (Fp.) floorplate, (Gut) tubo digestivo, (Mn.) mesonefro, (Not.) notocorda, (Som.) somitos.

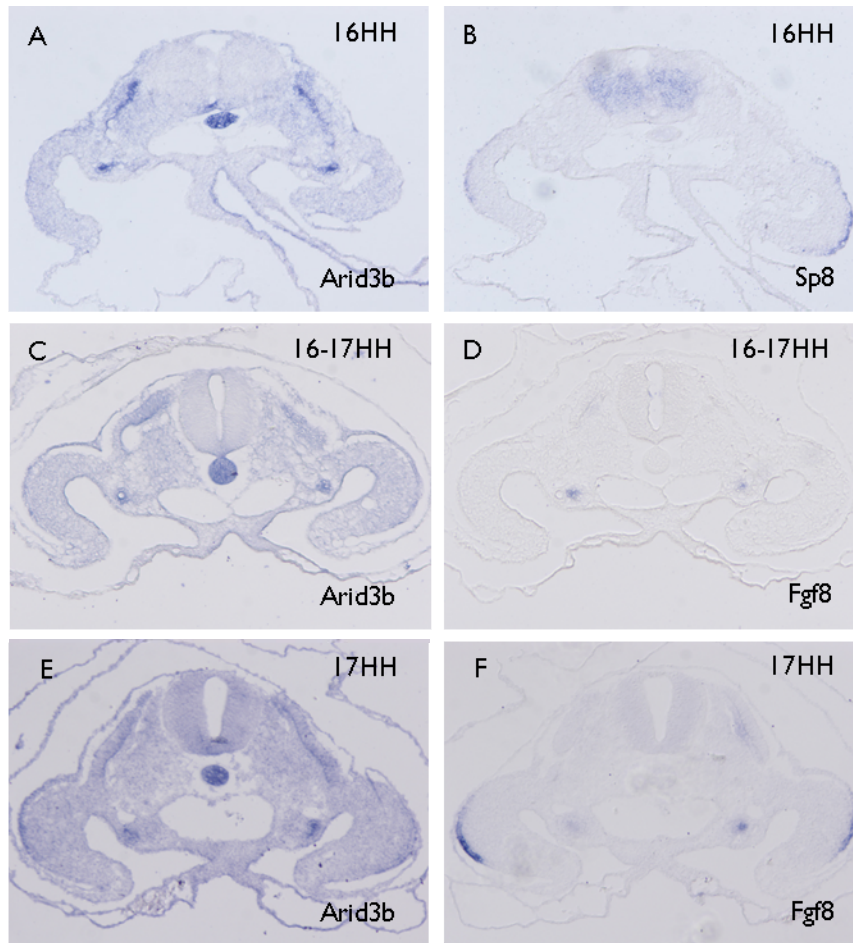
Posteriormente, se estudió el patrón de expresión en embriones de 24HH y se determinó que *Arid3b* se expresaba con intensidad en los ganglios de las raíces dorsales, arcos faríngeos, notocorda, floorplate, faringe, estómago y tubo digestivo posterior (Fig. 35). Además se observó que células *Arid3b*-positivas procedentes del miotomo, migraban hacia el interior de la extremidad en desarrollo. En estadio 26HH se pudo advertir que estas células migrantes ocupaban la región dorsal y ventral de la extremidad y se pudo determinar que expresaban marcadores musculares (Fig. 35).

Los datos anteriormente descritos mostraron un alto grado de conservación del patrón de expresión de este gen con respecto su homólogo en ratón.

### **1.2.5. Patrón de expresión de *Arid3b* en el primordio de la extremidad del embrión de pollo**

Durante el desarrollo del primordio de la extremidad de pollo, *Arid3b* pudo ser observado por primera vez a estadio 16-17HH en todo el ectodermo de la extremidad. La aparición de este gen se comparó de manera precisa con el inicio de la expresión de *Sp8*, un marcador temprano de cresta ectodérmica apical (AER) en pollo y con un marcador más tardío de esta estructura como es *Fgf8*. El gen que codifica para el factor de transcripción SP8 aparece implicado en la inducción y mantenimiento de la cresta ectodérmica apical y comienza a expresarse a estadio 16HH (Kawakami et al., 2004). En esa etapa de desarrollo, *Sp8* se expresa con intensidad en todo el ectodermo mientras que *Arid3b*, aunque se ha comenzado a expresar, no son más que unas pocas células, a lo largo del ectodermo, donde se localiza la señal (Fig 36). *Fgf8* se considera uno de los marcadores de cresta ectodérmica apical más importantes y en el embrión de pollo comienza a expresarse a estadio 16-17HH (Capdevila and Izpisua Belmonte, 2001). Su expresión al inicio abarca la zona central y parte de ventral del ectodermo para posteriormente restringirse a la cresta ectodérmica apical. En hibridaciones *in situ* en secciones consecutivas de embriones 16-17HH se observó como el ectodermo del primordio ha comenzado a expresar *Arid3b* mientras que en esa etapa de desarrollo aún no se pudo detectar expresión de *Fgf8* (Fig. 36). Posteriormente, en embriones de 17HH se pudo determinar que la expresión de *Arid3b* comenzaba a restringirse a una parte central del ectodermo con cierto dominio ventral, de manera muy similar a la observada en el gen *Fgf8* a esos estadios.

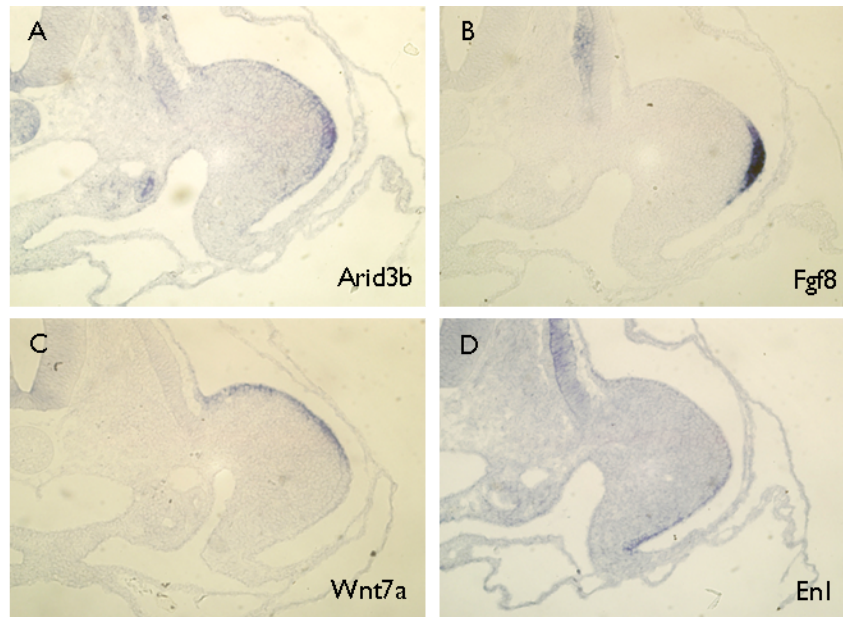
Para delimitar con exactitud el patrón de expresión de este gen se realizó un análisis comparativo de los patrones de expresión a estadios 18-19HH entre *Arid3b* y otros genes implicados en la formación de la extremidad, incluyendo genes con restricciones dorso-ventrales (Fig. 37). De este estudio se dedujo que *Arid3b*, en estos estadios, presentaba una expresión similar a la de *Fgf8*, marcador de cresta ectodérmica apical. En etapas siguientes se pudo contemplar como *Arid3b* se delimitaba al AER donde permanecía hasta estadio 30HH, momento en el que comenzaba a desaparecer, primero de la parte anterior y más tarde de la posterior (Fig. 38).



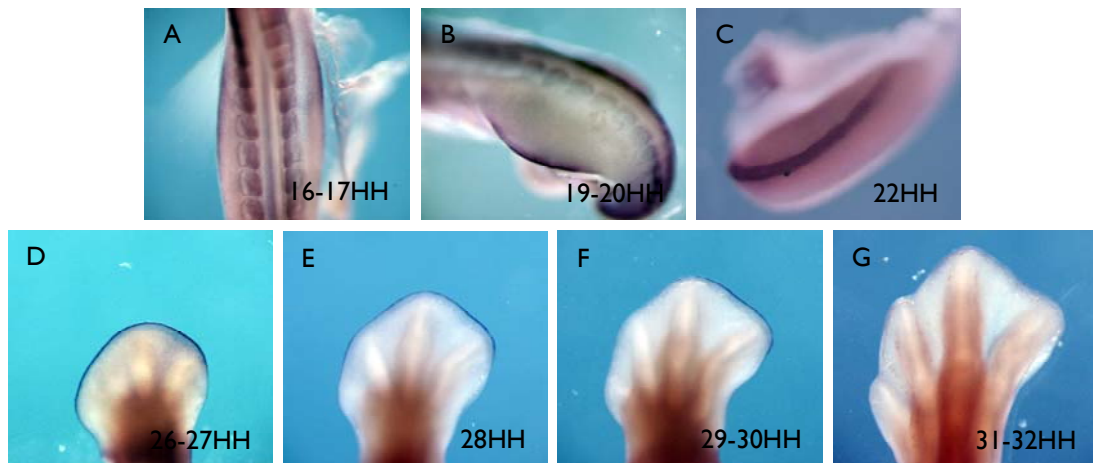
**Figura 36:** Hibridación *in situ* en secciones transversales en las que se compara el orden de aparición de *Arid3b*, *Sp8* y *Fgf8* en el primordio del embrión de pollo a diferentes estadios. A y B) Hibridación *in situ* en secciones consecutivas a 16 HH no muestran señal de *Arid3b* en el ectodermo mientras que la expresión de *Sp8* es evidente. C y D) A estadio 16-17HH algunas células del ectodermo del primordio comienzan a expresar *Arid3b* mientras que *Fgf8* es imposible de detectar en una sección consecutiva. E y F) Tanto *Arid3b* como *Fgf8* son totalmente evidentes en secciones de embriones de estadio 17HH.

Este resultado confirmó los experimentos previos realizados en ratón y nos permitió deducir que, pese a que no es uno de los marcadores más tempranos, *Arid3b* se expresa con anterioridad a *Fgf8* en el ectodermo del primordio. Además, esta expresión en el ectodermo se restringe al AER durante su formación y se mantiene en esta estructura hasta estadios muy avanzados. Este patrón de expresión podría indicar un posible papel de *Arid3b* durante el desarrollo de la extremidad, particularmente durante la constitución y funcionamiento de la cresta ectodérmica apical también en el embrión de pollo.





**Figura 37:** Hibridación *in situ* en secciones consecutivas que muestra el patrón de expresión de diferentes marcadores (*Arid3b*, *Fgf8*, *Wnt7a* y *Engrailed1*) en el primordio de la extremidad de embriones de pollo de estadio 18HH.



**Figura 38:** A-G) Hibridación *in situ* que muestra la expresión de *Arid3b* en el primordio de la extremidad de pollo a diferentes estadios. A) *Arid3b* se detecta por primera vez en el primordio a estadio 16-17HH. B-D) Esta expresión corresponde a la cresta ectodérmica apical (AER). E-G) A partir de estadio 28HH, *Arid3b* disminuye, desapareciendo primeramente de la parte anterior del AER y siendo indetectable a estadio 31-32HH.

### **1.2.6. *Arid3b* es un marcador de la cresta ectodérmica apical**

Para demostrar inequívocamente que *Arid3b* era un marcador de AER, se llevaron a cabo diferentes ensayos (Fig. 39):

1. Inducción de AERs ectópicos mediante la sobreexpresión de  $\beta$ -catenina constitutivamente activa:

Publicaciones anteriores demostraron que la activación de manera constitutiva de la vía canónica de Wnts, mediante la sobreexpresión de  $\beta$ -catenina activada en el ectodermo del primordio de la extremidad, inducía la formación de AERs ectópicos (Kawakami et al., 2004; Kengaku et al., 1998). Para reproducir este resultado, se co-electroporaron embriones de pollo de estadio 10-11HH con un plásmido, PCGN- $\beta$ -cat $\Delta$ N, que contenía el gen de la  $\beta$ -catenina modificado de manera que se expresaba una forma activa (Zhurinsky et al., 2000), y un plásmido de expresión con GFP (PCAGGS/EGFP). Los especímenes se recogieron a 72h post-electroporación. Los embriones recolectados (n=3) presentaron niveles detectables de GFP/ $\beta$ -catenina en diferentes regiones del ectodermo de la extremidad en desarrollo. En uno de los embriones, estructuras similares a AERs ectópicos fueron detectadas en parte de las zonas electroporadas. Sobre este espécimen se realizó una hibridación *in situ* en secciones consecutivas con la sonda de *Arid3b* y la sonda de *Fgf8* como control positivo. Las formaciones analizadas presentaban cierto grado de complejidad estructural así como expresión de GFP y *Fgf8*, marcador de cresta ectodérmica apical. La expresión de *Arid3b* fue claramente detectada en estos AERs ectópicos.

2. Inducción de extremidades ectópicas en embriones tempranos mediante la colocación de microesferas impregnadas de FGF8 en el flanco:

Como demostraron estudios anteriores, la colocación de microesferas impregnadas con FGF8 en lugares específicos del flanco del embrión de pollo a estadios muy concretos, era capaz de inducir la formación de extremidades ectópicas con cierta frecuencia (Crossley et al., 1996). Mimetizando dichos ensayos se colocaron microesferas con FGF8 en el flanco de embriones de estadios comprendidos entre 14-16HH (n=10). Se recogieron los embriones a las 20 horas y se observó la formación de primordios de la extremidad ectópica en algunos de los embriones manipulados (n=2). Se realizaron hibridaciones *in situ* con la sonda de *Arid3b* y se detectó activación ectópica de este gen en los primordios inducidos, especialmente en regiones del ectodermo cercanas a la microesfera (n=2) incluyendo la cresta ectodérmica apical.

3. Eliminación de la cresta ectodérmica apical mediante la colocación de microesferas impregnadas del inhibidor SU5402:

La aplicación, en las proximidades del AER, de microesferas impregnadas de SU5402, inhibidor específico de la vía de FGFs, provoca la interrupción de manera localizada de este centro de señalización (Kawakami et al., 2004). Se reprodujeron

dichos experimentos y se colocaron subapicalmente microesferas con SU5402 en primordios de la extremidad de estadio 19HH. Los embriones recogidos presentaban primordios más cortos en el eje próximo-distal y en un 33% (n=9) de los casos presentaban ausencia de AER en las proximidades de la microesfera. Se observó que, en estos embriones, la expresión de *Arid3b* se encontraba ausente en estas regiones.

#### 4. Expansión de la cresta ectodérmica apical en el eje antero-posterior mediante la colocación de microesferas impregnadas en FGF10:

La aplicación de microesferas impregnadas en FGF10 y colocadas subapicalmente en posición anterior provocaban una expansión en el eje antero-posterior de marcadores de AER (Kawakami et al., 2004). Se colocaron microesferas impregnadas de FGF10 en primordios de la extremidad de embriones de estadio 19HH (n=8) y se recogieron 6-10 horas después. Sobre los especímenes que aún conservaban la microesfera, se realizó una hibridación *in situ* con la sonda de *Arid3b* y se observó en un 60% de los casos (n=5) una expansión de este gen en la región anterior, coincidente con la extensión del AER.

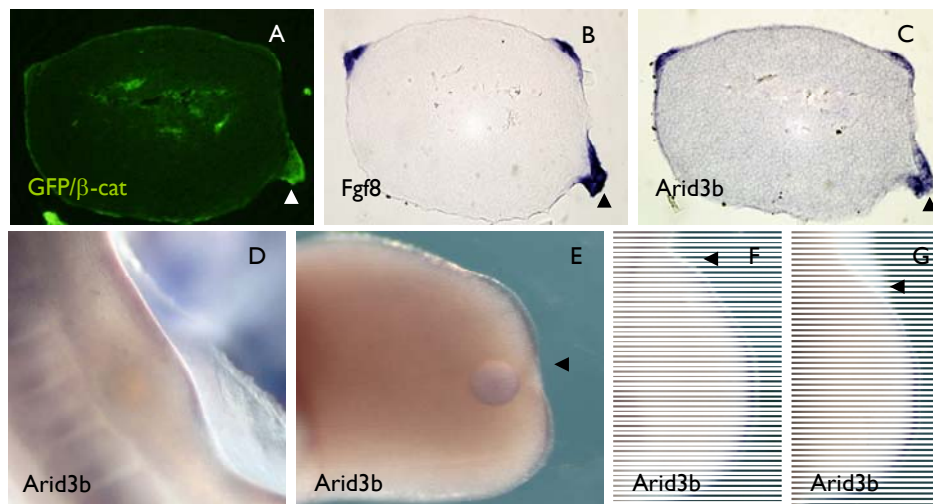


Figura 39: A-C) Secciones transversales al eje próximo-distal de un primordio co-electroporado con un plásmido que sobreexpresa una forma constitutivamente activa de  $\beta$ -catenina y el plásmido PCAGGS/GFP y recogido a 72 horas post-electroporación. A) Expresión de GFP observada directamente bajo un microscopio de fluorescencia. Puede evidenciarse la aparición de un AER ectópico en la región de máxima expresión (punta de flecha). B-C) Hibridaciones *in situ* en secciones consecutivas evidenciaron que estos AERs ectópicos expresaban el marcador de cresta ectodérmica apical *Fgf8*, así como *Arid3b*. D) Se observó expresión de *Arid3b* en el AER de primordios inducidos ectópicamente, mediante la aplicación de microesferas impregnadas en FGF8 y recogidos a las 20 horas. E) Hibridaciones *in situ* con la sonda de *Arid3b* demostraron que, la aplicación en el mesénquima distal del primordio de microesferas impregnadas en el inhibidor de FGFs, SU5402, provocan interrupciones en el AER y con ellas, la desaparición parcial de *Arid3b* en el primordio. F-G) Hibridación *in situ* con la sonda de *Arid3b* tras la colocación de microesferas de FGF10 en el mesénquima subapical del primordio y recogida de embriones a las 6-10 horas. F) Expansión de la expresión de *Arid3b* provocada por una extensión del AER tras colocación de estas microesferas. G) Expresión de *Arid3b* en un primordio control sin microesfera de FGF10.

En este apartado se ha demostrado, mediante la activación o inhibición de diferentes vías, que este gen responde a señales que provocan tanto la inducción del AER, como cambios en su morfología o integridad.

### 1.3. Clonaje del gen Arid3b de pollo

#### 1.3.1. Identificación y clonaje del gen Arid3b de pollo

Para realizar el clonaje del gen *Arid3b* de pollo se partió de la secuencia EST obtenida en la base de datos de ESTs de pollo de Manchester. Mediante un ensayo de *blast* de esta EST sobre el genoma del pollo en el servidor ENSEMBL, por homología de secuencia, se obtuvo la secuencia IDENSGALG00000001376, situada en el cromosoma 10, como candidata. En ese momento y basándose en secuencias consenso, existían dos posible transcritos predichos. Con el objetivo de clonar el gen expresado y fundamentándonos en dicha secuencia se diseñaron unos oligonucleótidos flanqueantes. A continuación, partiendo de cDNA de embriones de pollo de estadio 20-22HH y utilizando estos oligonucleótidos se amplificó por PCR una banda que correspondía al gen de interés, tal y como se comprobó por digestión y secuenciación (para mayor detalle véase Materiales y Métodos). El análisis de los clones resultantes revelaron que:

1. Los clones obtenidos eran idénticos entre sí en el tamaño del fragmento (1683 pb), así como en la secuencia (Tabla 5).

**Tabla5: secuencia del cDNA clonado perteneciente al gen Arid3b de pollo**

```

ATGAAGCTGGAAGCTGTGGTCGAGCAGCTGCAGAAGCAGCAGCAGAAGCAGCAGGCTCCTCTGCAGATGGATT
CCAGGGAGAGACAGCAGAGGCAGATGAGAGAAGCCAGCTGCTCTACACACAGCAGCTGGCCGTGCAGCAGG
CCGTGCTGGCAGCCACATCTGGCAGGGCAGCAGGCGGCTCTGCTGTCGGTCCCTTGCCAGAGGCCACCCG
CAGCCGGGGCCACGCGGGCTTTCGATCAGAGCAGCATGAATTCAGAGCCAGAAGAAGAAGAAGAGGACGA
GGAAGAGGAGGAAGATGAGGAGGAAGAGGAAGCGGGTTGGAAGGAGGAGATCTGGAGGATGCTGCTGATGT
GACTGGAAAAGAATCCTGCTCCGCTCTGAAATATTTTCACGCTCCCAAAGTTGCCCAACCAACCAAGAGTGG
CCTCTACCTCGAATCCTCTCCGGCCTCAGGGCACCAGAGGGGACAGCAGGGCAAAGAAGAACAGGGTAAGGA
CACTACTAAGCAGCCATATGCCGGCTCCCCGTCTGGACGCCAGAAGTGGAGATTGGATGAGCAGCTCAAACAGA
ACGGCAATGTGACCTGGAGTGATGAAGGTGATGGATGCCGAGGAAGAGAAATTTACGAGACTTTGCCAAGCTT
TATGAAGTGGATAGTGACCCCTGAACGGAAAGAGTTCCTGGATGACCTCTTCATCTTCATGCAGAAGAGGGGAAC
CCCCATCAACAGGATCCCCATCATGGCGAAGCAGATCCTGGATCTCTACATGCTCTACAACTGGTGACCGAGA
AGGGAGGGGCTGGTGGAGATCATCAACAAGAAGATCTGGAGGGAGATCACCAAAGGCCTTAATCTGCCACCTC
CATCACCAGTGCCGCGTTCACGCTTCGAACCCAGTATATGAAGTACCTATATGCCTACGAATGCGAGAAGAAAT
CCCTCAGTTCTCCTGCTGAGCTTCAGGCCGCCATCGATGGCAACAGGCGGGAAGGCAGACGGGCCAGCTACAG
CTCCTCTTTGTTGAGCTACTACCCACAGCCTCGGGGCCTCCTTCCCTCCTGTCTCCCCCAAGATCCGCTTCC
CCATCATCGGCGTCGCGCGGGCAGCGGGACCAGCAACCCTCGGGTGTCTCCAGCAGCAGCTGTCAGAAAAG
GTGACGGTGTGCCCTTGACCGTGTGATGCCAAATCGTATAGCTGTGCCAGTGACCTTGCTAGCCAGCAGGCC
ACGGTGGCAGCAAGAACGGCCACCCTGGAGCAGCTGCGGGAGAGGCTGGAGGCTGGGGAGCCACCAGAGAAG
AAGGTGTCGCGGATGACGGAGGAGGAGCAGCGGCTCGTCCAGCAGGCTCTGCAGCGCAACCTTTCAACATGG
CACGGCAGATCCCCATGAAGATCAAAATCAATGGCAAGGAAGACAAACCCGACTCGGCGGGCGGGCGGGCGGC
GCTGAATTTGTACCCCAATGGCATTGGGAGCATTAAATGTCGGTGGAGATTAAACGGCACAATTTATGCTGGCGT
GCTCTTTGCCAGAAGCCAGTCGTCCATCTCCTCGCGGGCTCGCAGAGCTCCTGCAGCAGCAGCAGCAGCTCC
CACTGCTCCCCCAGCCCTACCTCATCGCGGGGAACCCCAAGCGCAGAGCCCTCCACTAGCTGGTCTCTCTGA

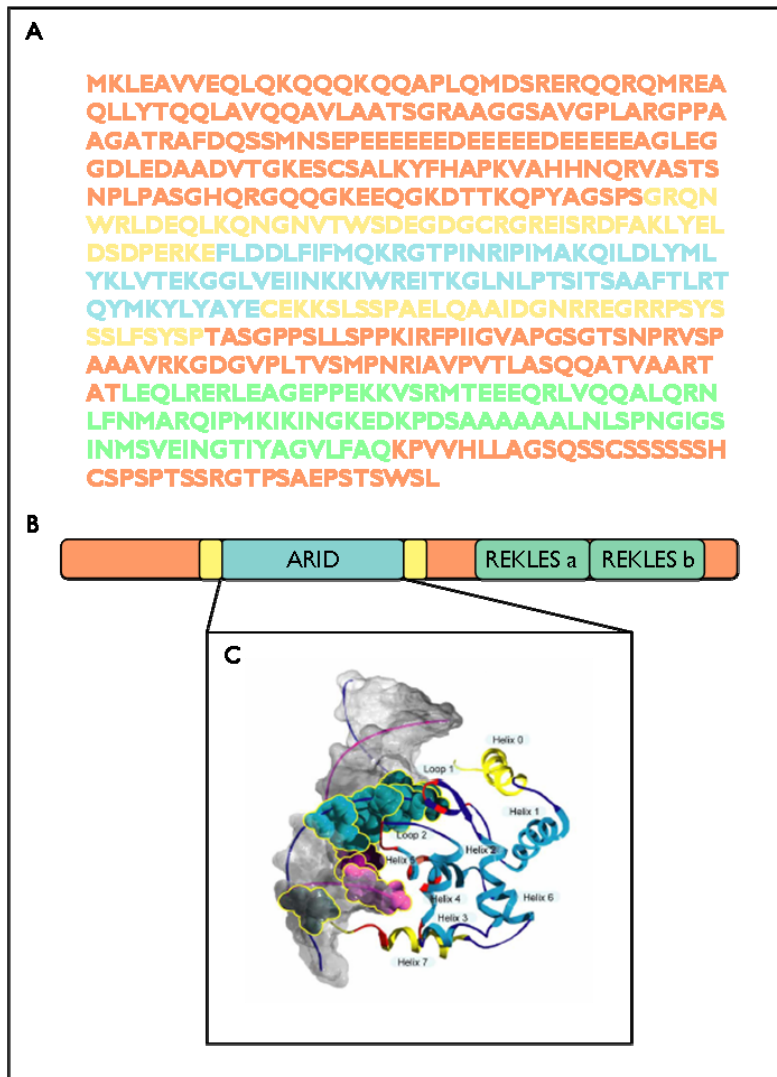
```

2. La secuencia y la estructura intrón-exón difería de los dos transcritos predichos por ENSEMBL en tres puntos primordiales:
  - La secuencia obtenida, basándonos en predicciones, presentaría 8 exones y no 10 como los transcritos propuestos por ENSEMBL.
  - El Exón<sub>1</sub> según la secuencia obtenida por nuestro grupo incluía al Exon<sub>1</sub>, intrón I<sub>1</sub> y Exón<sub>2</sub> predichas por el servidor ENSEMBL. La región intrónica ignorada por ENSEMBL se traduciría en una secuencia proteica muy rica en aminoácidos ácidos parcialmente conservada en las predicciones realizadas para ratón y humano.
  - El Exón<sub>7</sub> de los clones analizados correspondía a un fragmento de una región considerada intrónica por el servidor junto con el Exón<sub>9</sub> predicho.
3. Recientemente la base de datos ENSEMBL sólo contempla un único transcrito (IDENSGALG00000002097) para la secuencia IDENSGALG00000001376. Esta predicción es diferente a la propuesta con anterioridad y resulta muy similar al que se obtuvo en el laboratorio. Las dos únicas diferencias de esta predicción con respecto a nuestra secuencia es la ausencia de los dos primeros codones que codifican para una metionina y una lisina, así como la aparición de un codón extra que codifica para una alanina en el Exón<sub>7</sub>.
4. Los numerosos clones analizados por restricción y secuenciación compartían tamaño equivalente así como idéntica secuencia lo que parecía indicar que el fragmento obtenido era el único transcrito de la expresión del gen *Arid3b* en esta especie. Aunque no podemos descartar la presencia de otros transcritos debido a la utilización de promotores diferentes o *splicing* alternativo existen ciertas evidencias que no apoyan dicha hipótesis:
  - El cDNA molde utilizado procedía de diferentes estadios (20-22HH) lo cual favorecería la presencia de putativos transcritos alternativos. Sin embargo no se detectó variación en el tipo de clones obtenidos.
  - El uso de embriones enteros homogeneizados disminuía la posibilidad de obviar transcritos alternativos generados en diferentes tejidos embrionarios.
  - La ausencia de transcritos alternativos en otras especies (mosca, ratón o humano) sugería la inexistencia de otras variantes en pollo.
5. La comparación de la secuencia obtenida con respecto sus homólogos en otras especies indicaron un alto grado de conservación, especialmente entre vertebrados. Los resultados vienen resumidos en la tabla 6 y en la figura suplementaria 2. El grado de paralelismo se vio incrementado cuando se compararon las secuencias del dominio ARID de los diferentes homólogos (Tabla 6).

<b>Tabla 6: Comparación de la secuencia proteica predicha a partir del cDNA del gen <i>Arid3b</i> de pollo y homólogos en otras especies</b>		
	<b>Identidad</b>	<b>Similitud</b>
Pollo/Humano	69%	79%
Pollo/Ratón	65%	75%
Pollo/Mosca	44%	59%
Pollo/Humano ARID	97%	98%
Pollo/Ratón ARID	97%	98%
Pollo/Mosca ARID	80%	92%

6. En la secuencia obtenida se pudo observar la presencia de los dominios descritos anteriormente para *Dead ringer* y *Arid3b* en otras especies (Fig. 40). A modo de resumen, estos dominios son:

- **Arid:** Dominio de unión a DNA común en todos los miembros de la familia (Gregory et al., 1996; Iwahara and Clubb, 1999; Iwahara et al., 2002; Patsialou et al., 2005; Shandala et al., 2002). En la subfamilia eARID, existen además dos regiones extendidas que flanquean este dominio que favorece la especificidad de unión a sus secuencias diana (Kortschak et al., 1998) y que también aparecen en el *Arid3b* de pollo.
- **Reckles:** Dominio multifuncional implicado en la importación y exportación de este factor al núcleo (Kim and Tucker, 2006), interacción con matriz nuclear y formación de complejos multiméricos (Kim et al., 2007).



**Figura 40:** A) Predicción de la secuencia de aminoácidos de ARID3B en pollo en base al fragmento de DNA clonado. B) La proteína ARID3B de pollo presenta un alto nivel de conservación con respecto a otras especies, mostrando los dominios más representativos encontrados en sus diferentes homólogos. C) Uno de los dominios que mayor homología presenta es el dominio ARID de unión a DNA (Wilsker et al., 2005).

## **I.4. Análisis funcional del gen Arid3b en el embrión de ratón y pollo**

### **I.4.1. Electroporación eficiente del ectodermo prospectivo de la extremidad de pollo. Validación de la técnica**

Para los ensayos de ganancia y pérdida de función en el embrión de pollo se decidió poner a punto en el laboratorio la técnica de electroporación en el ectodermo de la extremidad prospectiva (Fig. 41).

Después de numerosas pruebas se establecieron unas condiciones que nos permitieron ser capaces de electroporar esta región con una eficiencia relativamente alta, obteniendo amplios parches de tejido electroporado. Los estadios embrionarios en los que se lograba un mayor grado de electroporación correspondían a 10-11HH (Fig. 41) siendo aceptables aquellos comprendidos entre 8HH y 14HH. Estas condiciones han sido descritas en el apartado Materiales y Métodos con anterioridad.

A la hora de poder monitorizar las células que sobreexpresaban la secuencia objeto de estudio, los embriones fueron co-electroporados con un plásmido que contenía nuestro segmento de interés junto con el mismo tipo de plásmido unido a GFP (PCAGGS/GFP).

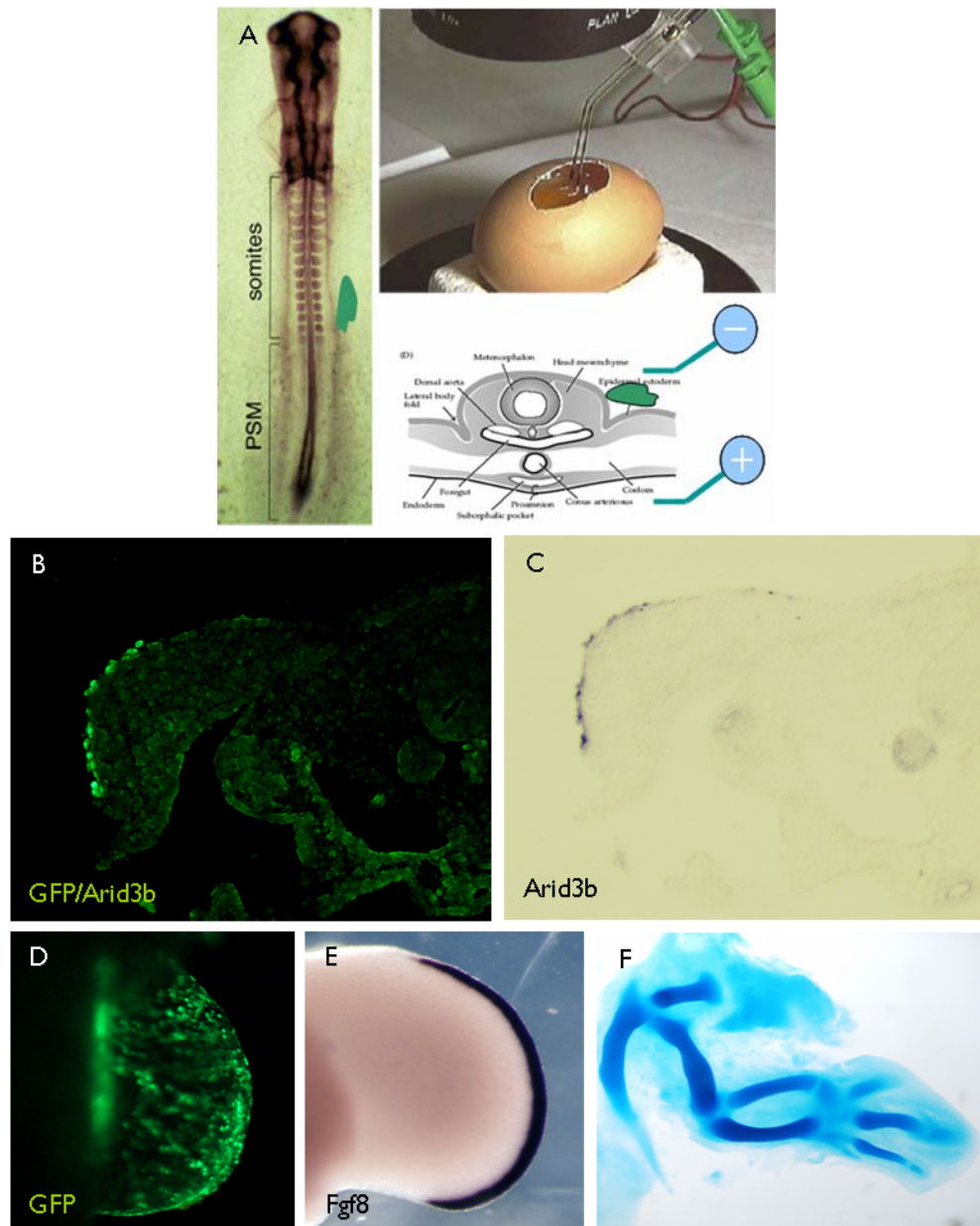
Para demostrar, con rigor, que las células que expresaban la proteína verde fluorescente eran además capaces de expresar la construcción de interés, parte de estos especímenes electroporados fueron procesados y cortados en el criostato. A continuación, en el microscopio de fluorescencia se observó la expresión de GFP en las secciones resultantes y se fotografiaron. Posteriormente se realizaron hibridaciones *in situ* sobre estas secciones con una sonda de RNA que reconocía dicha secuencia y también se fotografiaron. La comparación de las fotografías de las mismas secciones en uno u otro momento nos permitió determinar que las células que presentaban niveles detectables de GFP eran, a su vez, capaces de expresar nuestra secuencia de interés (Fig. 4I). Este resultado nos permitió:

- Monitorizar las células electroporadas en los diferentes embriones manipulados.
- Estipular que la observación de células GFP-positivas indirectamente mostraba las células que expresaban nuestra construcción.

Una propiedad de esta técnica es que nos permitía electroporar de manera específica el ectodermo de la región prospectiva de la extremidad. A lo largo de esta tesis doctoral, en ninguno de los embriones recogidos 24/48/72h después de la electroporación y que fueron cortados, se detectaron niveles de expresión de la secuencia clonada en el mesénquima del primordio (Fig 4I).

A la hora de buscar regiones del ectodermo con mayor susceptibilidad a sufrir la electroporación, no se encontraron resultados evidentes. Ectodermo dorsal, ventral y cresta ectodérmica apical se electroporaron con similar eficiencia. Cabe destacar que no se logró en ningún caso enfocar la electroporación a compartimentos aislados específicamente (ectodermo dorsal o ventral o AER) de manera voluntaria, lo que no nos ha permitido analizar efectos localizados de manera dirigida.





**Figura 41:** Electroporación en el ectodermo del primordio prospectivo del embrión de pollo. A) En embriones de estadio 10-11HH se añadió la solución que contiene los plásmidos de interés (PCAGGS/Arid3b y PCAGGS/GFP). A continuación se aplican pulsos con el voltaje adecuado. B y C) Sección de un embrión co-electroporado con PCAGGS/Arid3b y PCAGGS/GFP y recogido a 48 horas. Sección observada en el microscopio de fluorescencia que muestra cómo la expresión de GFP en el primordio aparece restringida únicamente al ectodermo (B) y coincide con la expresión de *Arid3b* observada por hibridación *in situ* en la misma sección (C). D- F) La co-electroporación de PCAGGS/GFP y PCAGGS vacío no produce alteraciones en el primordio de la extremidad ni en el AER. D) Expresión de GFP/Arid3b a la lupa de fluorescencia en un primordio electroporado y recogido a las 48 horas postelectroporación. E) Hibridación *in situ* con la sonda de *Fgf8* que muestra la expresión de este gen y la integridad del AER. F) Tinciones con Alcian green (cartílago) demuestran que estos embriones no presentan defectos en el patrón esquelético de las extremidades electroporadas.

Uno de los requisitos que exigió la técnica era demostrar que la propia manipulación que sufría el embrión en este tipo de experimentos, así como la descarga eléctrica proporcionada no interfería en el desarrollo normal de la estructura electroporada. Para ello co-electroporamos el plásmido vacío PCAGGS/SE junto con el vector PCAGGS/GFP en la región prospectiva de la extremidad en embriones de pollo de estadio 10HH. 48 horas después de la manipulación recogimos los especímenes supervivientes con altos niveles de electroporación (n=11) y seguidamente se analizaron la expresión de GFP, la morfología del primordio y la expresión de *Fgf8* (marcador de AER). Ninguno de los embriones recogidos presentó anomalías en los parámetros estudiados, así como en el patrón esquelético a estadios posteriores (Fig. 41).

#### **1.4.2. Ensayos de ganancia de función en el embrión de pollo: sobreexpresión de cArid3b en el ectodermo del primordio de la extremidad**

Para determinar una posible función de *Arid3b* en el desarrollo del primordio de la extremidad de pollo se co-electroporaron, con las condiciones anteriormente descritas, embriones de estadio 10-11HH con las construcciones PCAGGS/*Arid3b* y PCAGGS/GFP y se extrajeron los embriones a 24 horas, a 48 horas, a 72 horas y a 5-9 días.

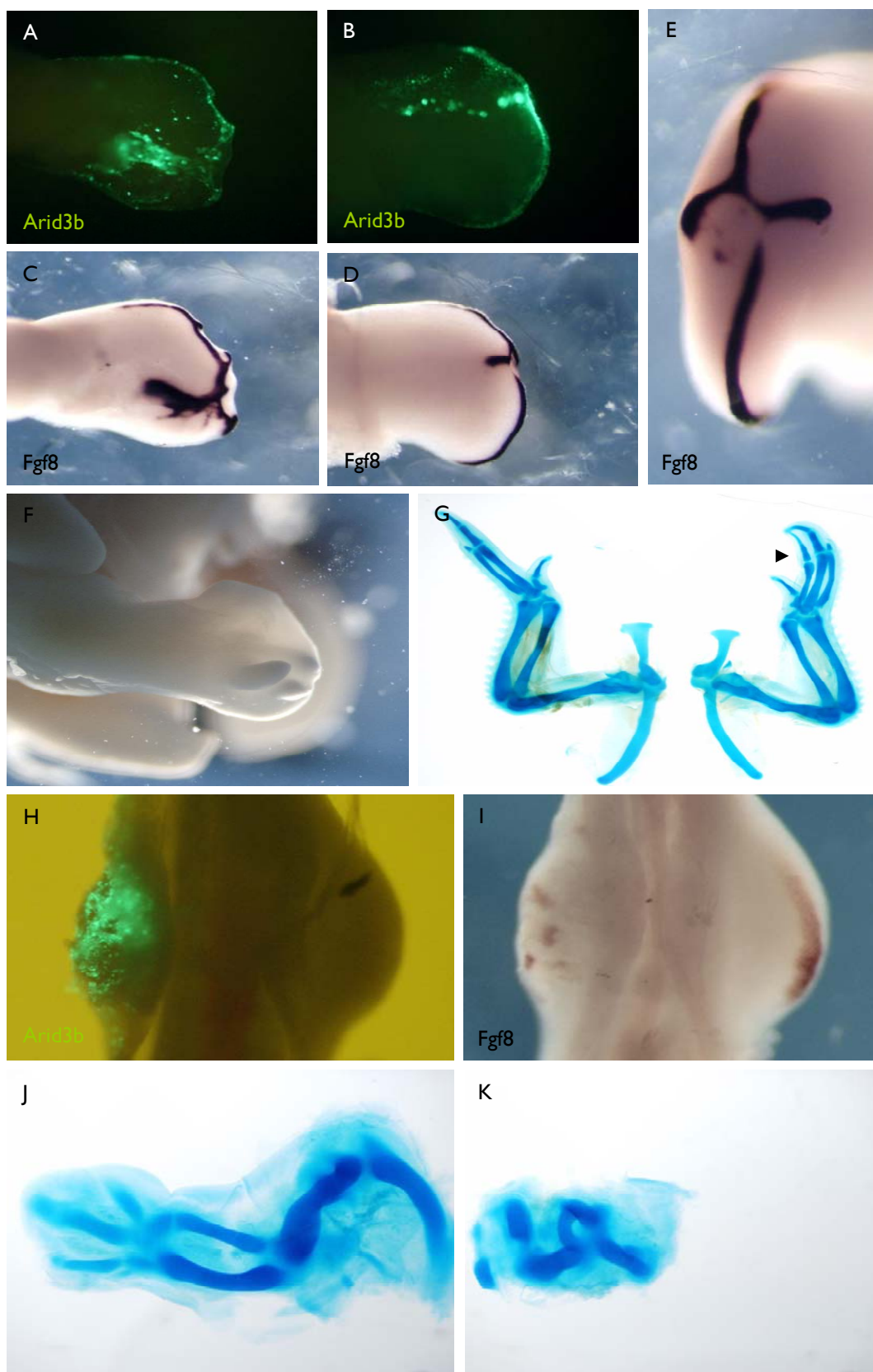
Las muestras recogidas a 24 horas o menos no presentaron fenotipo alguno aparente, aún observándose expresión de la proteína verde fluorescente.

Los especímenes recogidos a 48 horas post-electroporación, que mostraban altos niveles de expresión de GFP, se estudiaron a la lupa en detalle (Tabla 7). Se pudo detectar un defecto en los primordios de la extremidad, acompañado de alteraciones en la morfología de la cresta ectodérmica apical, en un 92% de los casos (n=37). Para comprobar a nivel molecular estas anomalías en la conformación del AER, se llevó a cabo una hibridación *in situ* con *Fgf8*, marcador de cresta ectodérmica apical. Este estudio reveló un alto grado de desorganización en el AER que provocaba la aparición de diferentes alteraciones en su conformación, entre las que se incluyen irregularidades en el borde, desplazamientos en el eje dorso-ventral o discontinuidades. De los especímenes que mostraron fenotipo (n=34), en un 74% de los casos el AER apareció con un alto grado de distorsión y trazado irregular mientras que en un 26% de los embriones, el grado de desorganización era tal que provocaba la desaparición del AER endógeno en gran parte de su superficie (Fig. 42). De los ejemplares que evidenciaron un trazado irregular (n=25), en un 36% de los casos se observó la aparición de AERs ectópicos unidos a la cresta ectodérmica apical endógena. Estas estructuras ectópicas se localizaban tanto en el ectodermo ventral como dorsal de manera indistinta. En un único caso se advirtió expresión de *Fgf8* ectópico separado del AER endógeno en posición dorsal.

Tabla 7: Ensayos de ganancia de función en el embrión de pollo a 48horas post-electroporación (n=37)			
Alteraciones en la morfología del AER/ desorganización de la cresta ectodérmica apical [34] (92%)			Sin fenotipo aparente [3] (8%)
AER con trazado irregular [25] (74%)		Desaparición parcial del AER [9] (26%)	
Trazado irregular no asociado a AERs ectópicos [15] (60%)	Trazado irregular asociado a AERs ectópicos [9] (36%)		
	AER ectópico separado del AER endógeno [1] (4%)		
[N]: Número de embriones recogidos con el fenotipo especificado			

Los embriones recogidos a 72 horas post-electroporación presentaban unos niveles inferiores de GFP. No obstante, esta expresión de la proteína verde fluorescente fue suficiente a la hora de identificar embriones satisfactoriamente electroporados. Estos especímenes fueron analizados en detalle a la lupa (Tabla 8) y se observó una evidente distorsión en la morfología de la cresta ectodérmica apical en un 100% de los embriones apropiadamente electroporados (n=15) (Fig. 42). Mediante hibridaciones *in situ* con *Fgf8* se pudieron detectar variaciones en el patrón de expresión de este marcador. De estas muestras, un 87% (n=15) presentaron un AER con trazado irregular mientras que en un 13% de los embriones estudiados (n=15) se observó desaparición parcial del AER endógeno. Dentro de los especímenes que mostraban una cresta ectodérmica apical con trazado irregular (n=13), en un 69% de los casos (n=13) se pudieron apreciar AERs ectópicos fusionados con el AER endógeno, bien en posición dorsal o ventral. Se observó un único caso de expresión ectópica de *Fgf8* alejada de la cresta ectodérmica apical endógena en posición ventral. Este fenotipo resultó similar al obtenido a 48 horas post-electroporación.

Tabla 8: Ensayos de ganancia de función en el embrión de pollo a 72horas post-electroporación (n=15)		
Alteraciones en la morfología del AER/ Desorganización de la cresta ectodérmica apical [15] (100%)		
AER con trazado irregular [13] (87%)		desaparición parcial del AER [2] (13%)
Trazado irregular no asociado a AERs ectópicos [3] (23%)	Trazado irregular asociado a AERs ectópicos [9] (69%)	
	AER ectópico separado del AER endógeno [1] (8%)	
[N]: Número de embriones recogidos con el fenotipo especificado		



**Figura 42:** Ensayos de ganancia de función en el embrión de pollo. La sobreexpresión de *Arid3b* en el ectodermo del primordio del embrión de pollo provoca una clara desorganización del AER. A, B y H) Expresión de GFP/*Arid3b*, observada en la lupa de fluorescencia, perteneciente a primordios electroporados con la forma silvestre de *Arid3b* y recogidos a 48 (H) y 72 horas (A y B) post-electroporación. C, D, E, I) Hibridaciones *in situ* con *Fgf8* evidencian severos defectos en la organización del AER de los primordios electroporados. F, G, J y K) A estadios posteriores, este defecto se traduce en la aparición de truncaciones con elementos ectópicos (F y punta de flecha en figura G); o en truncaciones (K) tal y como se muestra en estas tinciones con Alcian green (cartilago) o en embriones recién fijados a la lupa. En ocasiones ambos fenotipos aparecen en el mismo espécimen. (J) Tinción Alcian green (cartilago) en la extremidad contralateral sin manipular.

Analizando de manera pormenorizada los embriones electroporados a 48 y 72 horas, se pudo comprobar que las alteraciones en la morfología del AER correlacionaban sólo parcialmente con los parches de electroporación generados. Es decir, se pudieron encontrar, en un mismo primordio, regiones electroporadas cuya respuesta a la sobreexpresión de *Arid3b* provocaba diferentes resultados. A modo de ejemplo se observó que, parches de electroporación ubicados en las inmediaciones de la cresta ectodérmica apical, podían producir tanto desaparición o alejamiento del AER endógeno en esa región como generación de estructuras ectópicas asociadas. De igual manera, aunque en algunos ejemplares el área de ectodermo electroporado resultó muy extensa, únicamente en dos casos aislados se observó expresión ectópica de *Fgf8* separado del AER endógeno. Esto sugiere la posible existencia de procesos celulares autónomos y no autónomos para explicar los efectos de la sobreexpresión de *Arid3b*.

En los experimentos a tiempos largos, entre 5 y 9 días, se recogieron todos los embriones supervivientes ya que la GFP es indetectable a ese momento. En estos especímenes se evidenció que el 56% de los casos (n=36) presentaban irregularidades en el patrón esquelético de la extremidad (Fig. 42). De los embriones con alteraciones en pata o ala (n=20), un 50% mostraban truncaciones en el eje próximo-distal de diversa severidad. En el otro 50% se observaron truncaciones similares a las anteriores pero acompañadas de elementos ectópicos. Aunque, los elementos extra, localizados tanto en la región ventral como dorsal, correspondían a componentes del estilopodio o zeugopodio, lo observado con mayor frecuencia fue la aparición de dedos ectópicos o de sobrecrecimientos de tejido blando con apariencia de dedo (Fig. 42).

Cabe destacar que la distribución presentada a tiempos largos correlaciona con los efectos producidos a corto plazo, donde aproximadamente la mitad de los embriones evidenciaban pérdida de AER y la otra mitad AERs ectópicos.

La presencia de *Fgf8*, en mayor o menor medida, en los fenotipos obtenidos mostraron resultaron compatibles con una implicación de *Arid3b* en el proceso de estructuración de la cresta ectodérmica apical en esta especie.

#### **1.4.3. Ensayos de pérdida de función en el embrión de pollo: sobreexpresión de formas dominantes negativas de cArid3b en el ectodermo del primordio de la extremidad**

Para complementar los estudios de ganancia de función realizados en el embrión de pollo, se llevaron a cabo diferentes ensayos de pérdida de función en este modelo. Uno de los abordajes empleados durante la realización de esta tesis doctoral fue la sobreexpresión de formas dominantes negativas de *Arid3b* en el ectodermo del primordio de la extremidad.

Esta estrategia se basa en el hecho de que, cuando un factor de transcripción ejerce su función sobre el promotor de un gen, recluta una serie de moléculas que le permiten, una vez unido al DNA, activar o reprimir sus genes diana. Estas formas dominantes negativas son proteínas modificadas que, expresadas a altos niveles, secuestran dicha maquinaria asociada pero son incapaces de unirse al DNA, por lo tanto resultan incompetentes a la hora de actuar sobre el promotor. De esta manera, cuando la molécula endógena trata de reclutar su maquinaria asociada, esta aparece retenida por la forma dominante negativa, expresada a muchos más altos niveles y su acción sobre el DNA resulta ineficaz. Para generar dichas construcciones nos basamos en trabajos anteriores realizados con otros miembros de la familia ARID, donde se describían formas mutantes de estas proteínas y se caracterizaba su efecto dominante negativo. Sustentándonos en la alta conservación del dominio ARID entre los integrantes de esta familia, decidimos generar mutaciones equivalentes en el *Arid3b* de pollo.

- **cArid3b<sub>DNRW</sub>**: Esta construcción se basó en el mutante *retn/dri*<sub>ARID<sup>ΔH5</sup></sub> (Shandala et al., 2002), el cuál presenta una delección de la  $\alpha$ -hélice 4 ( $\alpha$ -hélice 5 según la nomenclatura otorgada a las  $\alpha$ -hélices en dicha publicación) que incapacita a la molécula a la hora de unirse al DNA. La actividad dominante negativa de esta molécula se demostró *in vivo*, en ensayos con embriones de *Drosophila melanogaster*. En dichos ensayos la sobreexpresión de este factor modificado aumenta la severidad de los fenotipos en ejemplares heterocigotos para *Dri/Retn*. Los aminoácidos WREITKG, eliminados en nuestro mutante, son los encargados de formar dicha  $\alpha$ -hélice (Fig. 43).
- **cArid3b<sub>DNY312A</sub>**: Esta construcción fue fundamentada en el mutante Bright<sub>Y330A</sub> murino y en la versión humana de dicho mutante Bright<sub>Y324A</sub> (Nixon et al., 2004; Rajaiya et al., 2006). En estas publicaciones se sustituía una tirosina (aminoácido n°330/324), situada dentro de la  $\alpha$ -hélice 7, por una alanina, provocando un severo descenso en la capacidad de unión a DNA. Dichas moléculas actuaban como dominantes negativas tal y como se mostró en ensayos de movilidad electroforética EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) en células transfectadas con dichas construcciones. En el gen *Arid3b* de pollo esta tirosina de la  $\alpha$ -hélice 7 se encuentra emplazada en la posición 312. Para generar esta forma dominante negativa, dicha tirosina se sustituyó igualmente por el aminoácido alanina (Fig. 43).

Ambas secuencias mutantes se generaron por técnicas de mutagénesis dirigida y se clonaron en el plásmido PCAGGS/SE para su posterior electroporación.

En este abordaje de pérdida de función mediante la sobreexpresión de formas dominantes negativas, se electroporaron embriones de 10-11HH con cada una de las construcciones generadas junto con el plásmido PCAGGS/GFP. Los especímenes manipulados fueron recogidos a 24 horas, 48 horas, 72-80 horas y 5-9 días. Destacamos que los resultados obtenidos fueron idénticos, con una u otra forma dominante negativa, lo que nos ha permitido su utilización de manera indistinta.

En ninguna de las muestras recolectadas a 24 horas con altos niveles de expresión de GFP se observó fenotipo aparente.

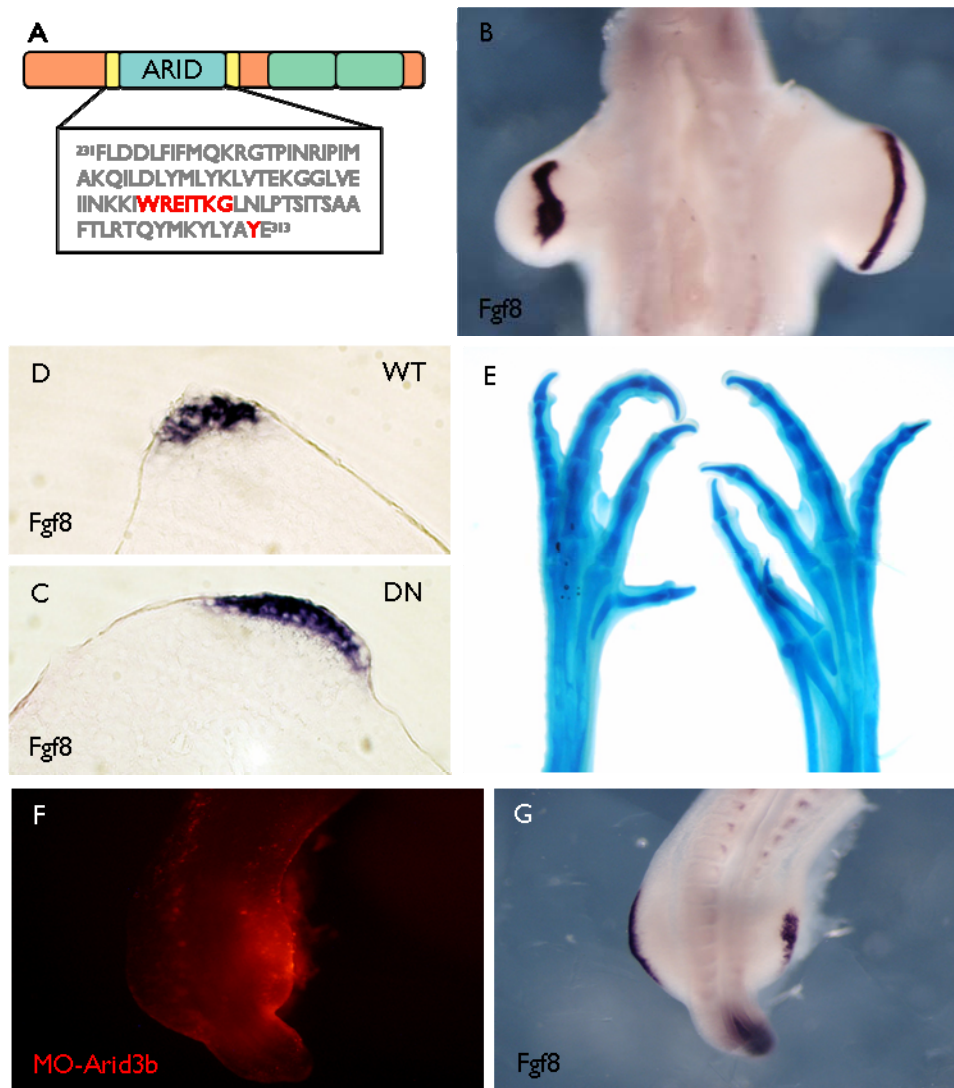
Se recogieron embriones que presentaban altos niveles de GFP en el primordio de la extremidad 48 horas después de la electroporación. En estas muestras se pudo observar que en un 55% (n=66) de los casos el primordio de la extremidad presentaba un AER muy difícil de detectar a la lupa. Cuando se realizó hibridación *in situ* con *Fgf8* sobre estos especímenes se reveló una cresta ectodérmica apical desestructurada, con borde irregular, más corta en el eje antero-posterior y extendida en el eje dorso-ventral y de bordes irregulares. Se realizaron secciones sobre estos embriones y se determinó que mostraban serios defectos en la morfogénesis del AER, presentando una apariencia aberrante así como un menor número de capas celulares que el AER control (Fig. 43).

En los embriones recolectados a 72-80 horas la expresión de GFP empezaba a atenuarse, sin embargo se pudieron recoger muestras con adecuados niveles de esta proteína. En estos embriones se realizaron hibridaciones *in situ* en especímenes enteros así como hibridaciones *in situ* en secciones de parafina con la sonda de *Fgf8*. Un 57% (n=46) exhibían claros defectos en la estructuración de la cresta ectodérmica apical similares a los determinados a 48 horas. De estas muestras afectadas (n=26), en un 81% se observaron alteraciones en la morfología del AER así como un menor número de capas celulares en esta estructura. Interesantemente, en un 19% de los casos se detectaron fallos en la estructuración de este centro de señalización acompañado de un incremento exagerado en el número de capas celulares. La mayoría de los embriones que mostraron dicho fenotipo, fueron recogidos a 80 horas. Este resultado pone de manifiesto, que la capacidad de la cresta ectodérmica apical para formar capas *per se* no se ve alterada tras la sobreexpresión de las formas dominantes negativas de *Arid3b*. Sin embargo demuestra que existe un defecto en la compactación y estructuración histológica del AER.

A tiempos largos, entre 5 y 9 días se observó, en primer lugar, un descenso muy significativo en la viabilidad de estos especímenes. De las muestras supervivientes, en un 19% (n=21) se revelaron truncaciones de la extremidad con elementos ectópicos, especialmente dígitos, mientras que en un 5% se observaron únicamente truncaciones a diferentes niveles en el eje próximo distal (Fig. 43).

De los resultados obtenidos mediante la sobreexpresión de las formas dominantes negativas de *Arid3b*, se pudo determinar que este gen es esencial durante el proceso de organización y compactación de la cresta ectodérmica apical en el embrión de pollo, aunque no parece implicado en la inducción de un marcador de esta estructura como es *Fgf8*.





**Figura 43:** Ensayos de pérdida de función en el embrión de pollo. A) Esquema que representa los dominios del factor de transcripción ARID3B. En rojo las modificaciones realizadas en el dominio ARID para la generación de formas dominantes negativas. B, C y D) Hibridaciones *in situ* con la sonda de *Fgf8* revelaron que la sobreexpresión de formas dominantes negativas de *Arid3b* produce defectos en la estructuración de la cresta ectodérmica apical a 48-72 horas, observándose AERs más anchos en el eje dorso-ventral y más cortos en el eje antero-posterior. E) Estos embriones, recogidos a 5/9 días y teñidos con Alcian green, mostraron que estas alteraciones se traducen en la aparición de elementos ectópicos y, en ocasiones, truncaciones. F y G) La electroporación de morfolinós contra *Arid3b* produce un fenotipo similar al observado tras electroporar formas dominantes negativas. F) Observación a la lupa de fluorescencia de la lisamina que presentan los morfolinós electroporados. G) Hibridación *in situ* con *Fgf8* que muestra las irregularidades en el AER de los ejemplares electroporados.



#### **1.4.4. Ensayos de pérdida de función en el embrión de pollo: electroporación de morfolinós específicos contra cArid3b en el ectodermo del primordio de la extremidad**

Los morfolinós son análogos sintéticos de nucleótidos que se usan como herramientas moleculares para disminuir la función del gen diana al que se dirigen. Estas moléculas se utilizan como oligonucleótidos antisentido y son capaces de bloquear, con alta eficiencia, la expresión de un gen de interés, bien interfiriendo con el correcto *splicing* del mRNA o bien impidiendo su traducción.

Se electroporaron morfolinós, contra el gen *Arid3b* de pollo, en embriones de estadios 10-11HH. Se recogieron los especímenes electroporados a 30 horas y se observó la señal fluorescente bajo la lupa. La primera conclusión que se pudo obtener de este tipo de ensayos fue que la eficiencia de electroporación de los morfolinós era muy inferior a la obtenida con vectores plasmídicos. De todos los embriones manipulados sólo un 7% (n=200) presentaron niveles detectables del morfolino en el ectodermo del primordio. En especímenes con parches de electroporación (n=15), se realizaron hibridaciones *in situ* con *Fgf8* y pudimos observar en un 47% de los casos, alteraciones en la morfología de la cresta ectodérmica apical. El AER generado presentaba un nivel de compactación inferior, un acortamiento en el eje antero-posterior y un ensanchamiento en el eje dorso-ventral con respecto al del primordio control (Fig. 43).

La eficiencia de electroporación a la hora de introducir el morfolino control resultó similar a la obtenida con el morfolino contra *Arid3b*. Un 11% de los embriones electroporados (n=18) presentaron un grado aceptable de fluorescencia en el ectodermo del primordio. En estas muestras no se evidenció ningún tipo de alteración morfológica en el AER ni en el patrón de expresión de *Fgf8*.

Estos datos, sumados a los alcanzados en los dos apartados anteriores, refuerzan la posibilidad de que *Arid3b* tenga un papel primordial en la conformación estructural del AER del embrión de pollo durante su formación.

#### **1.4.5. Estudios de falta de función del gen mArid3b en el embrión de ratón. Presentación de la línea CD1.129P2Arid3b<sup>Gt(RR)028</sup>Byg. Genotipado de los embriones**

Los ensayos de ganancia y pérdida de función en el embrión de pollo sugerían un papel principal del gen *Arid3b* en el desarrollo de la extremidad en esta especie, concretamente en el proceso de estructuración de la cresta ectodérmica apical. Para confirmar estos resultados, y determinar si el papel de *Arid3b* en la morfogénesis del AER se conservaba en embriones de otros vertebrados, se llevó a cabo la generación de una línea de ratón deficiente para este gen.

Para ello se obtuvo una línea de células madre embrionarias murinas que poseían una mutación insercional (*gene-trap*) en el locus de *Arid3b*. Esta línea celular, procedente de la empresa Bay Genomics (Stryke et al., 2003), fue denominada por la compañía como RRJ028. La construcción utilizada para provocar la mutación insercional, su localización

aproximada dentro del locus así como la metodología empleada en la generación y genotipado de ratones heterocigotos *Arid3b*<sup>+/-</sup> ha sido analizada en detalle con anterioridad en el apartado Materiales y métodos. Únicamente mencionar que en esta línea se produce  $\beta$ -galactosidasa como una proteína de fusión con ARID3B. A este respecto, aunque no tenemos evidencias de la estabilidad de dicha molécula, sabemos que el enzima  $\beta$ -galactosidasa es totalmente funcional. Asimismo, el fragmento del gen *Arid3b* que se expresa no incluye el dominio ARID de unión a DNA, por lo que podemos afirmar que este gen no puede ejercer su función como factor de transcripción.

Aunque los datos proporcionados por la compañía indican que la inserción mutacional se localiza en algún segmento del intrón<sub>1</sub>, este intrón muestra una extensión de 21Kb y la ubicación exacta de la mutación en este fragmento es desconocida. Por esta razón nos ha resultado imposible diseñar oligos y genotipar los ratones mutantes homocigóticos *Arid3b*<sup>-/-</sup> mediante PCR convencional. Los intentos de identificar el punto preciso de inserción mediante ampliificaciones parciales por PCR de secuencias internas o PCR inversa no fueron exitosos. Por ello se llevó a cabo la siguiente aproximación utilizando la capacidad de la inserción mutacional de expresar  $\beta$ -galactosidasa para determinar el genotipo de los embriones. Los especímenes mutantes homocigotos presentaban dos copias del gen de la  $\beta$ -galactosidasa, una en cada locus mutado, mientras que los heterocigóticos poseían una única copia y los silvestres ninguna. Por este motivo, en tinciones lac-Z de estos tres tipos de embriones, la intensidad de señal obtenida debería ser diferente.

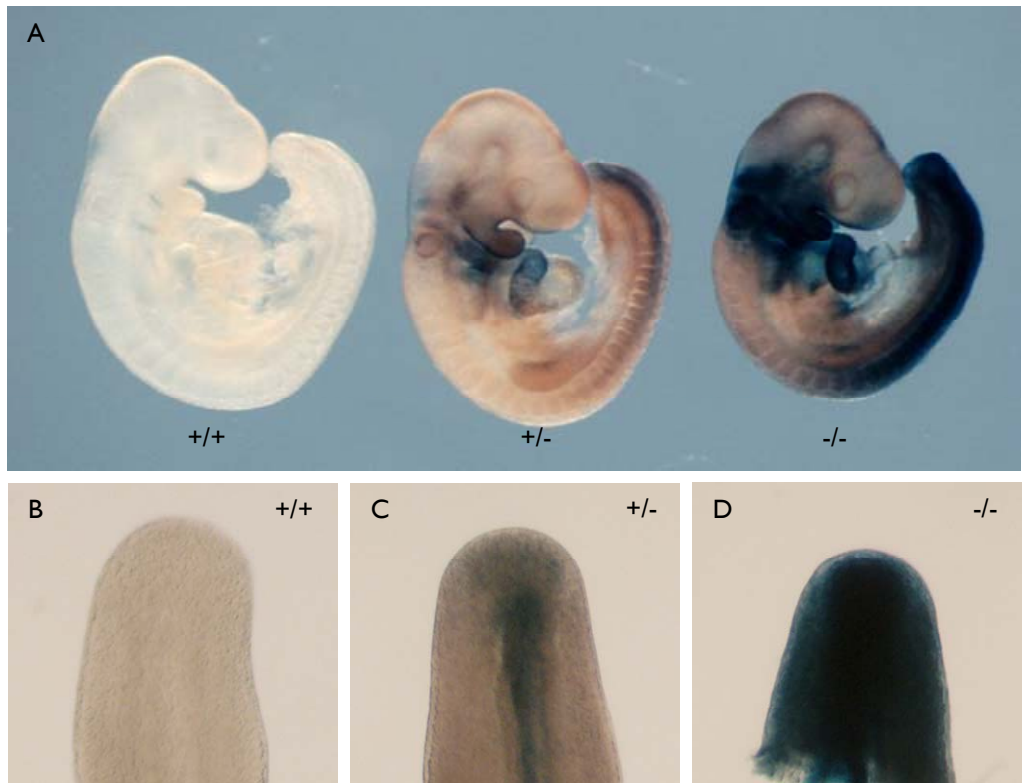
Se extrajeron embriones de estadio E9.5 procedentes de la misma camada generados a partir de cruces entre ratones heterocigotos *Arid3b*<sup>+/-</sup>. Se realizó una tinción lac-Z tal y como se relató anteriormente en la sección de Materiales y métodos. A idénticos tiempos de revelado, las muestras procedentes de especímenes mutantes homocigotos (*Arid3b*<sup>-/-</sup>) presentaron niveles de tinción muy superiores a los obtenidos en las muestras de embriones mutantes heterocigotos (*Arid3b*<sup>+/-</sup>). No se encontró ningún tipo de señal en las muestras obtenidas a partir de embriones silvestres/wt. Este método de genotipado resultó muy útil y fiable ya que es totalmente reproducible y nos permite distinguir inequívocamente embriones con diferentes genotipos (Fig. 44).

Una variante de este tipo de ensayos se llevó a cabo rutinariamente para el genotipado de los embriones utilizados. En estos genotipados, la tinción se realizó sobre fragmentos aislados de la parte distal de la cola de los embriones (Fig. 44).

#### **1.4.6. Estudios de falta de función del gen m*Arid3b* en el embrión de ratón. Fenotipo de los embriones mutantes homocigotos ARID3b<sup>-/-</sup>**

Machos heterocigotos *Arid3b*<sup>+/-</sup> se pusieron en cruce con hembras heterocigotas del mismo tipo con el fin de generar ratones mutantes homocigotos de falta de función para *Arid3b*. La incapacidad de genotipar estos especímenes por métodos convencionales (PCR o *Southern blot*) y la posibilidad tanto de genotipar, como de analizar el patrón de expresión de estos embriones, mediante tinción lac-Z, nos llevó a recoger especímenes a diferentes etapas de gestación. A estadio E10.5 se evidenció un severo descenso en los embriones *Arid3b*<sup>-/-</sup> recogidos. Además se pudieron observar

evidentes signos de deterioro en embriones supervivientes con este genotipo. Los resultados de este estudio se resumen en la tabla 9.



**Figura 44:** Tinciones lac-Z, llevadas a cabo en paralelo, en embriones de estadio E9.5 procedentes de un cruce  $Arid3b^{+/-}$  X  $Arid3b^{+/-}$ . De izquierda a derecha se puede distinguir las diferentes intensidades de señal pertenecientes a especímenes wt, heterocigotos y homocigotos para la mutación insercional. B-D) Misma técnica empleada en fragmentos de cola de embriones  $Arid3b^{+/+}$ ,  $Arid3b^{+/-}$  y  $Arid3b^{-/-}$  y utilizada rutinariamente para genotipar especímenes. Esta técnica resulto muy reproducible y fiable.

<b>Tabla 9: Viabilidad de embriones resultantes de cruces <math>Arid3b^{+/-}</math> x <math>Arid3b^{+/-}</math></b>			
Estadio	-/-	+/-	+/+
8.5	34/109 (31%)	45/109 (41%)	30/109 (28%)
9.5	48/164 (29%)	81/164 (49%)	36/164 (22%)
10.5	44/305 (15%)	168/305 (55%)	92/305 (30%)

Nunca se rescataron embriones  $Arid3b^{-/-}$  a 11 días y medio después de la fecundación. Este dato junto con los resultados de la tabla indicaba que la ausencia del gen *Arid3b* causaba defectos incompatibles con el desarrollo embrionario. A continuación describiremos los fenotipos observados en embriones homocigotos  $Arid3b^{-/-}$  (Fig. 45).

1. Los embriones mutantes homocigotos  $Arid3b^{-/-}$  evidencian una ausencia de grandes vasos en el saco vitelino.

En los especímenes  $Arid3b^{-/-}$  recogidos a E10.5 se pudo observar una disminución de vasculatura en el saco vitelino. Analizando estas estructuras en detalle, a estadio E9.5 no se percibieron diferencias en la formación del plexo vascular primitivo, sin embargo, se pudo advertir una ausencia de grandes vasos a estadios posteriores (E10.5). Además, en la deficiente red vascular encontrada se reveló una clara disminución en la cantidad de sangre que contenían.

2. Los embriones mutantes homocigotos  $Arid3b^{-/-}$  muestran un retraso evidente en el crecimiento.

En los embriones  $Arid3b^{-/-}$  extraídos a diferentes tiempos se evidenció un severo retraso en el crecimiento embrionario. Este retraso se comenzó a detectar de manera sutil, en embriones de E9-9.5, haciéndose completamente evidente a E10.5. Los especímenes analizados en esta última fase mostraban un tamaño similar al esperado con un día menos de desarrollo.

3. Los embriones mutantes homocigotos  $Arid3b^{-/-}$  presentan defectos en el cierre del tubo neural.

Un fenotipo observado de manera muy frecuente en los embriones  $Arid3b^{-/-}$  obtenidos a estadio E10.5 fue un tubo neural incorrectamente cerrado y de apariencia ondulante. Aparentemente este defecto resulta más evidente en la región anterior del espécimen. Dicho fenotipo es detectable desde día 9.5 de gestación pero prácticamente imperceptible en estadios anteriores.

4. Los embriones mutantes homocigotos  $Arid3b^{-/-}$  presentan malformaciones en la formación de estructuras craneofaciales.

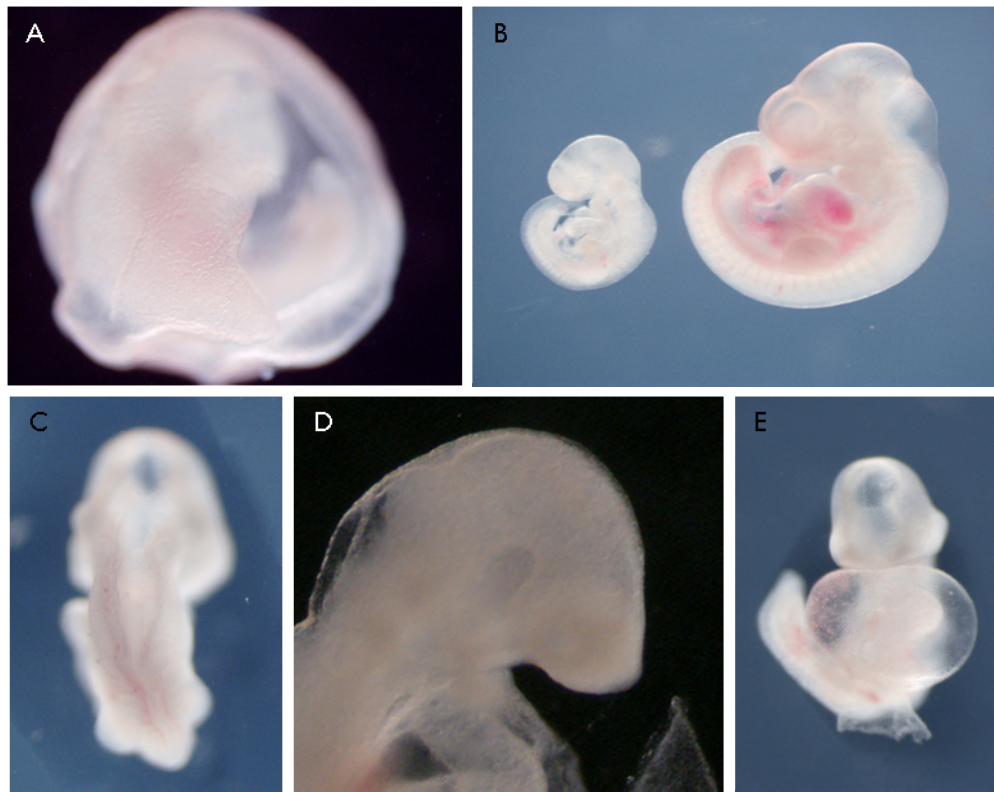
Con alta frecuencia se recolectaron especímenes  $Arid3b^{-/-}$  con malformaciones en la región rostral. Se detectó una severa hipoplasia de los arcos branquiales acompañada por una disminución en el tamaño de estructuras craneofaciales.

5. Los embriones mutantes homocigotos  $Arid3b^{-/-}$  muestran alteraciones en la formación del corazón y en la organización y disposición de vasos sanguíneos.

En embriones  $Arid3b^{-/-}$  de E9.5 se pudo observar una dilatación moderada del pericardio. Un día más tarde en el desarrollo de estos embriones esta dilatación pericárdica incrementó hasta, en algunas ocasiones alcanzar un tamaño similar al del propio espécimen. Se analizó el fenotipo cardíaco a E10.5 bajo la lupa y se observó una interrupción en el proceso del giro del tubo cardíaco. A pesar de estos defectos y una aparente disminución de las células miocárdicas, detectada en secciones de este órgano, el corazón es capaz de latir.

Además, estos mutantes mostraron hemorragias en diferentes puntos del embrión, sugiriendo una posible alteración en la formación de los vasos sanguíneos. En un estudio realizado en mayor detalle se observó que muchos de estos vasos evidenciaban un trazado irregular, desorganizado en

comparación con los individuos control. Además, no se pudo detectar circulación en estos vasos a pesar de la presencia de latido cardiaco.



**Figura 45:** Fenotipo de los embriones *Arid3b*<sup>-/-</sup> a estadio E10.5. A) Defectos en la vasculatura del saco vitelino. B) Evidente retraso en el crecimiento. C) Anomalías en el cierre del tubo neural. D) Malformaciones en estructuras craneofaciales. E) Alteraciones en el giro del corazón y dilatación del pericardio.

6. Los embriones mutantes homocigotos *Arid3b*<sup>-/-</sup> evidencian defectos en la formación de las extremidades.

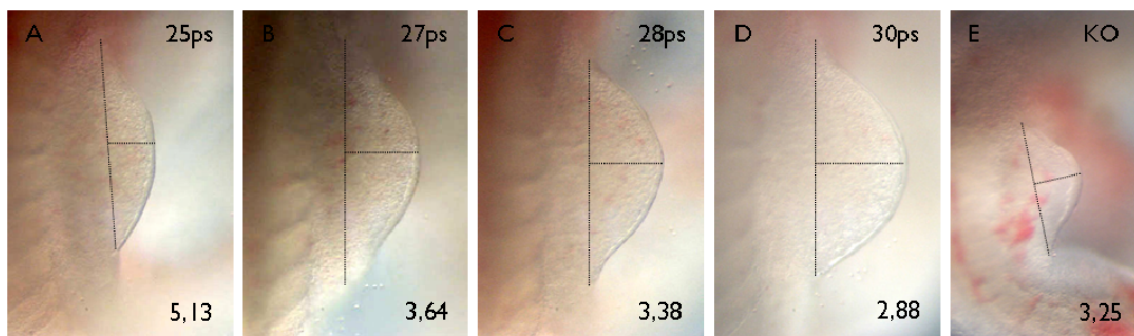
En los especímenes recogidos con vida a estadio E10.5, se observó una disminución del tamaño del primordio de la extremidad, presentando anomalías en la morfología de la cresta ectodérmica apical.

Debido a que los embriones mutantes *Arid3b*<sup>-/-</sup> presentan un retraso en el crecimiento, así como cierto estado de deterioro a estadio E10.5, hubiese resultado incorrecto comparar hermanos de camada entre sí ya que podría llevarnos a interpretar erróneamente los defectos en algunos procesos.

Para intentar estandarizar la edad de desarrollo equivalente entre los embriones *Arid3b*<sup>-/-</sup> y embriones wt, en especial para la etapa de formación de la cresta ectodérmica apical, se contaron los somitos formados en embriones *Arid3b*<sup>-/-</sup> a estadio E10.5. Se pudo apreciar un descenso significativo en el número de estos, acorde con el retraso en el desarrollo mostrado por estos especímenes. Los somitos cuantificados (aproximadamente 26-28 pares de

somitos respecto a los 34-36 de sus hermanos de camada) indicaban un retardo de algo menos de un día.

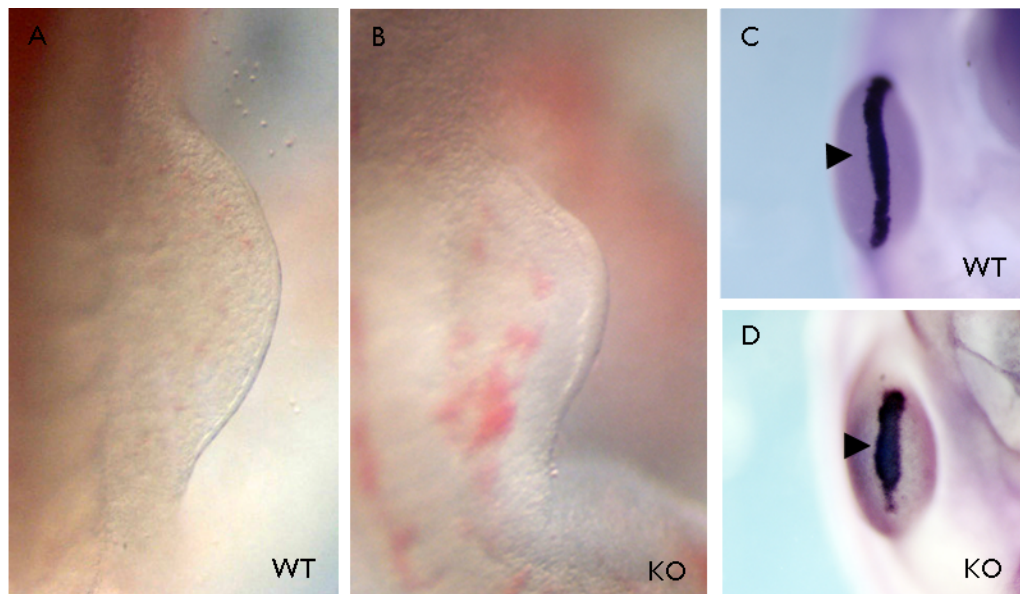
Por ello, se contempló la posibilidad de utilizar embriones con 26-28 pares de somitos como controles equivalentes, sin embargo, el primordio de la extremidad en los embriones *Arid3b*<sup>-/-</sup>, pese a presentar un tamaño reducido, resultó ser una de las estructuras del embrión aparentemente menos perjudicadas por el fenotipo general de estos especímenes. Los primordios de embriones *Arid3b*<sup>-/-</sup> de estadio E10.5 mostraban una morfología algo más madura de lo que correspondía al tamaño obtenido y a los somitos contabilizados. Debido a esto, se realizó un estudio comparativo de las dimensiones relativas de estos primordios frente a sus controles a diferentes etapas embrionarias (n=2 por cada estadio). Se midió la base del primordio y se determinó la distancia entre esta base hasta el punto más distal. La relación obtenida entre ambas medidas fue el parámetro contrastado. De este ensayo se concluyó que los primordios de los embriones *Arid3b*<sup>-/-</sup> a estadio 10.5, aunque mostraban un tamaño absoluto inferior, eran comparables a los observados a estadio E9.5-10 (entre 28 y 30 ps), por lo que los controles seleccionados correspondieron a especímenes en estas etapas de desarrollo (Fig. 46).



**Figura 46:** Estudio morfométrico del primordio de la extremidad superior en embriones de ratón a diferentes estadios. Los parámetros medidos son la distancia entre el lado anterior y posterior en la base del primordio y la altura en la parte central de éste. La relación entre ambos parámetros es el valor contrastado. Este valor en los primordios de los embriones *Arid3b*<sup>-/-</sup> se corresponde con el observado en primordios de especímenes wt de 28-30 pares de somitos. A-E) Visiones dorsales de primordios de extremidad superior pertenecientes a embriones recién extraídos.

Se realizaron hibridaciones *in situ* en embriones *Arid3b*<sup>-/-</sup> y en respectivos controles con *Fgf8*, revelándose un AER de conformación aberrante, con borde irregular, reducción de tamaño en el eje antero-posterior y extensión en el eje dorso-ventral en los especímenes mutantes (Fig. 47).





**Figura 47:** Los embriones *Arid3b*<sup>-/-</sup> muestran un fenotipo en el primordio de la extremidad. A, B) Imágenes en campo claro de un primordio de un embrión wt de 28 pares de somitos y de un ejemplar *Arid3b*<sup>-/-</sup> en los que se aprecia una clara diferencia en la morfología de la cresta ectodérmica apical. C y D) Hibridaciones *in situ* con la sonda de *Fgf8* demuestran, molecularmente, una clara desorganización del AER en embriones mutantes homocigotos. Esta cresta ectodérmica apical resultó más extensa en el eje dorso-ventral y más corta en el eje antero-posterior.

Se llevaron a cabo hibridaciones *in situ* en secciones de parafina de estos embriones con la sonda de *Fgf8* y se pudo determinar que el AER formante presentaba un aspecto plano y desestructurado con un máximo de una o dos capas celulares. Sin embargo en un bajo número de embriones recogidos muertos a estadios posteriores, E10.5-II, se observaron AERs con un excesivo número de capas celulares de morfología aberrante. Los anteriores resultados revelaron un posible retraso en el proceso de maduración de AER, al menos en sus primeras etapas, no obstante parece que dicho defecto pudiera ser transitorio. Lo que parece claro es que el proceso de organización histológica de la cresta ectodérmica apical es deficiente en estos embriones pero que la facultad de esta estructura para estratificarse no se ve comprometida.

El fenotipo observado en los mutantes homocigotos de falta de función de *Arid3b* mostró un papel relevante de este gen en la formación de numerosas estructuras anatómicas así como en la propia viabilidad del embrión. Además, estos resultados corroboran los obtenidos en el embrión de pollo y confirman un papel conservado del gen *Arid3b* en el proceso de estructuración de la cresta ectodérmica apical en el desarrollo de la extremidad de vertebrado.

## **1.5. Análisis funcional del gen *Arid3b* en el embrión de ratón y pollo: mecanismo**

### **1.5.1. Análisis de genes implicados en la formación del primordio de la extremidad de vertebrados**

Con el propósito de determinar el mecanismo molecular por el cual, el gen *Arid3b* actúa en el proceso de formación de la cresta ectodérmica apical, se analizaron una serie de marcadores relevantes en la morfogénesis de la extremidad de vertebrado. El patrón de expresión de estos genes fue examinado tanto en embriones de pollo electroporados con las construcciones utilizadas en los ensayos de ganancia y pérdida de función, como en embriones mutantes homocigotos *Arid3b*<sup>-/-</sup> y sus respectivos controles.

- Análisis del patrón de expresión de genes implicados en el establecimiento del eje dorso-ventral:

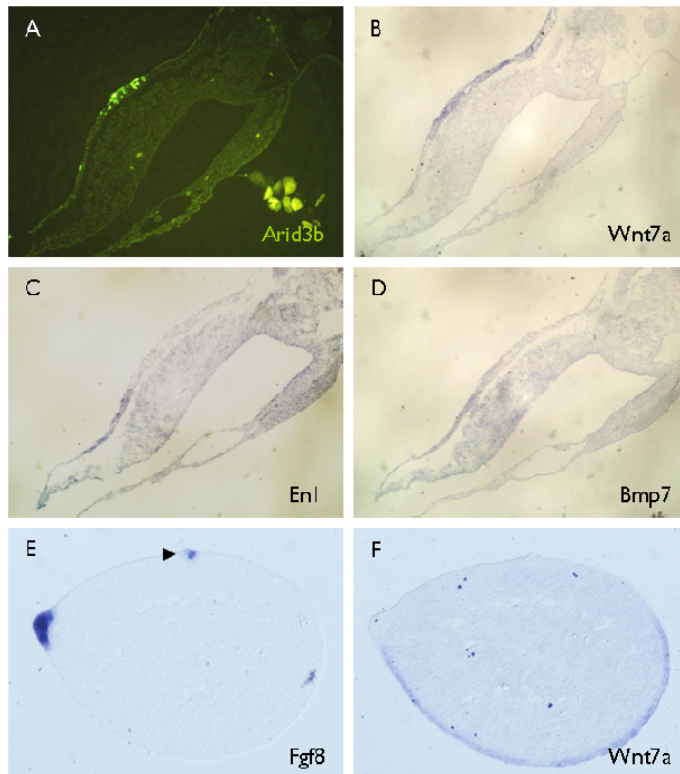
La cresta ectodérmica apical se localiza, de manera precisa, en el borde establecido entre el ectodermo dorsal y ventral. Ensayos de ganancia y pérdida de función en genes implicados en la formación del eje dorso-ventral han revelado, no sin cierta controversia, un papel fundamental de éstos en el correcto emplazamiento del AER (Ahn et al., 2001; Chen and Johnson, 1999; Fernandez-Teran and Ros, 2008; Laufer et al., 1997; Logan et al., 1997; Loomis et al., 1996; Loomis et al., 1998; Pizette et al., 2001; Rodriguez-Esteban et al., 1997).

*Engrailed1* (*En1*) se expresa en el ectodermo ventral del primordio de la extremidad de vertebrado. Este factor de transcripción es inducido por BMPs expresadas también en el ectodermo ventral proporcionando identidad ventral al primordio. *En1*, a su vez, reprime la expresión en el ectodermo ventral de la molécula de secreción WNT7a. Ésta, aparece restringida al ectodermo dorsal, y a través de *Lmx1b*, expresado en el mesénquima dorsal confiere identidad dorsal al primordio.

El fenotipo observado en los mutantes *Arid3b*<sup>-/-</sup>, así como en los ensayos de electroporación en embrión de pollo, resultaban compatibles con una alteración en el adecuado establecimiento del eje dorso-ventral.

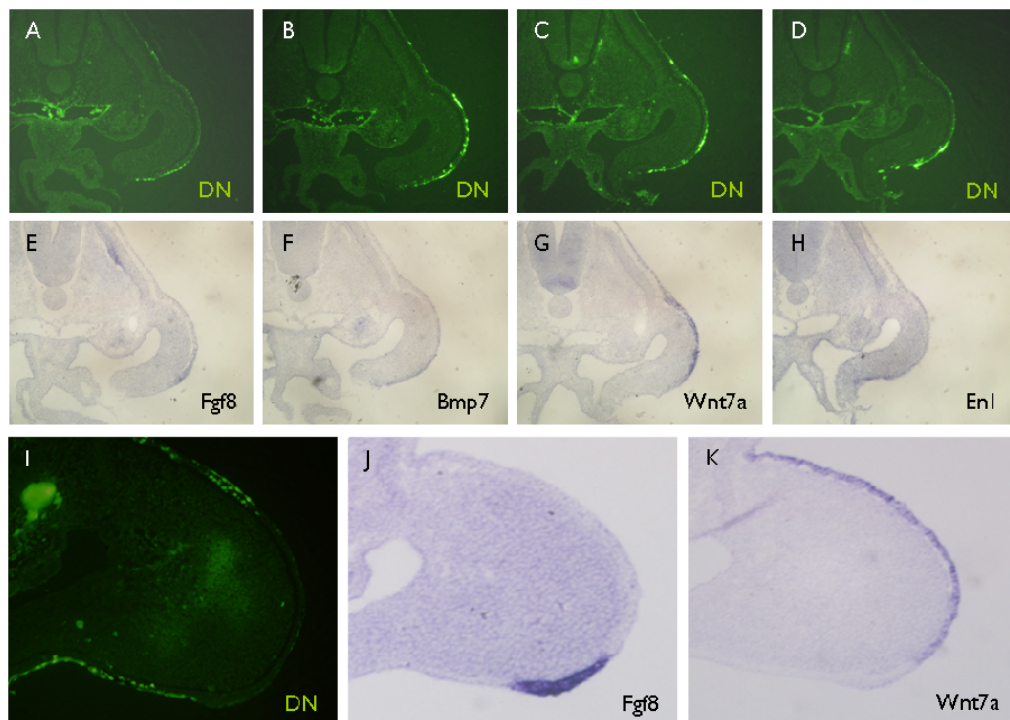
Para analizar el posible rol de *Arid3b* en este proceso en el embrión de pollo se analizó el patrón de expresión de *Bmp7*, *En1* y *Wnt7a* en embriones electroporados con la construcción que sobreexpresa la forma wt de *Arid3b* a 30 horas, 48 horas y 72 horas post-electroporación. No se detectó, en ningún caso, alteración en el patrón de expresión de estos genes respecto al primordio control (n=2 por tiempo de recogida) (Fig. 48). En los embriones recogidos a 72 horas en los que se observaron AERs ectópicos, no se establecieron nuevos bordes dorso-ventrales a cada lado de estas estructuras (Fig. 48).





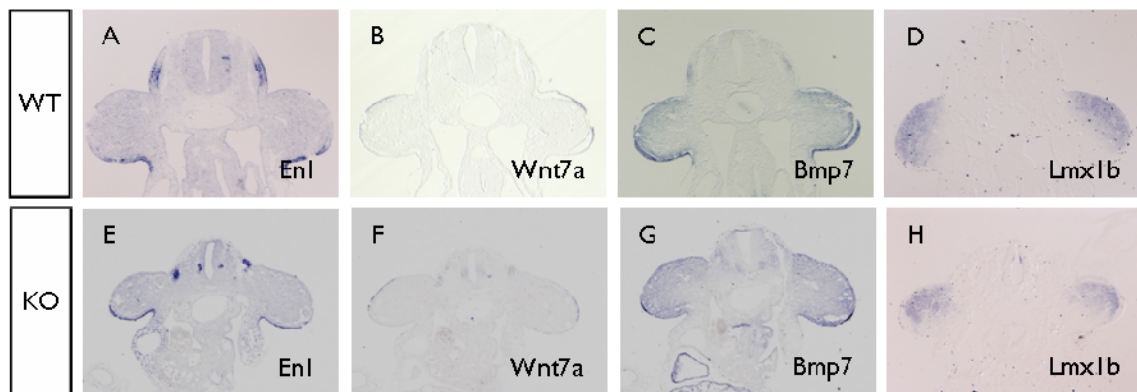
**Figura 48:** La sobreexpresión de *Arid3b* en el ectodermo del primordio no modifica el patrón de expresión de marcadores dorso-ventrales. A-D) Secciones transversales consecutivas de un embrión electroporado con la forma wt de *Arid3b* y recogido a 30 horas postelectroporación. A) Expresión de GFP/*Arid3b* observada al microscopio de fluorescencia. B C y D) Hibridaciones *in situ* en secciones transversales con las sondas de *Wnt7a*, *Enl* y *Bmp7*. No se observan cambios en el patrón de expresión de estos genes. E y F) Secciones transversales al eje próximo-distal de un primordio recogido a 72 horas postelectroporación. Expresión de *Fgf8* y *Wnt7a* mediante hibridación *in situ* en secciones consecutivas. No se generan nuevos bordes dorso-ventrales flanqueando al AER ectópico (punta de flecha).

A continuación se realizó este mismo estudio de marcadores dorso-ventrales en embriones electroporados con una de las formas dominantes negativas (*cArid3b<sub>DNHW</sub>*) y recogidos a 30 horas y 48 horas. No se evidenció ninguna variación en el patrón de expresión de dichos genes (n=2 por tiempo de recogida) (Fig. 49).



**Figura 49:** La sobreexpresión de formas dominantes negativas de *Arid3b* no produce cambios en el patrón de expresión de marcadores de ectodermo dorsal (*Wnt7a*) o ventral (*Bmp7* y *En1*) ni a 30 horas (A-D) ni a 48 horas (I-K) postelectroporación. A-D) Expresión de GFP en un embrión electroporado con una de las formas dominantes negativas y recogido a 30 horas. E-H) Hibridación *in situ* con la sonda de *Fgf8* y las sondas anteriormente nombradas. I) Expresión de GFP a la lupa de fluorescencia de un primordio electroporado con una de las formas dominantes negativas y recogidos a 48 horas después de la electroporación. J, K) Hibridación *in situ* con las sondas de *Fgf8* y *Wnt7a* en secciones consecutivas de estos embriones.

Posteriormente se llevaron a cabo hibridaciones *in situ* en secciones de parafina con los genes *Bmp7* (n=3), *En1* (n=3), *Wnt7a* (n=3) y *Lmx1b* (n=2) en embriones mutantes *Arid3b*<sup>-/-</sup> a estadio de desarrollo E10.5. En ninguno de los genes analizados se detectó variación alguna respecto a su control (Fig. 50).



**Figura 50:** Hibridaciones *in situ* en secciones transversales demuestran que el patrón de expresión de marcadores dorso-ventrales se mantiene inalterado en embriones *Arid3b*<sup>-/-</sup> con respecto a sus respectivos controles. A-D) Hibridación *in situ* en secciones con las sondas especificadas en embriones control. E-H) Hibridación *in situ* en secciones con las sondas especificadas en embriones *Arid3b*<sup>-/-</sup>.

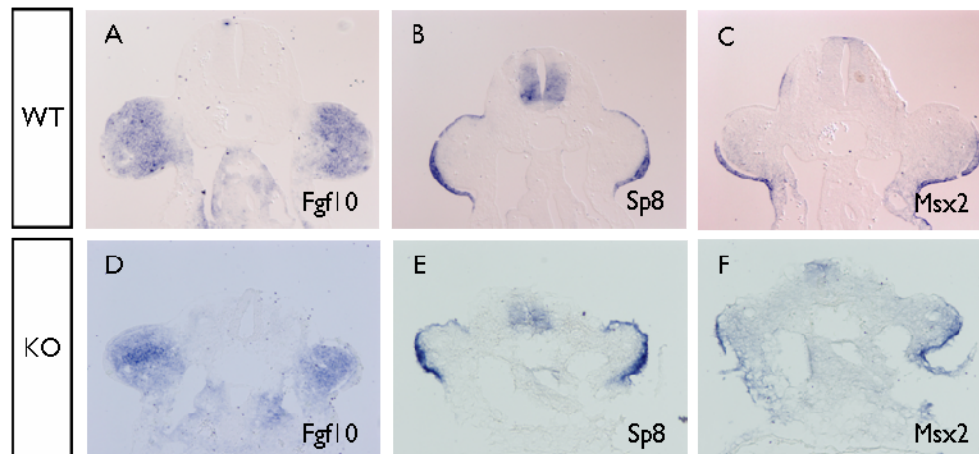
Estos resultados nos permiten concluir que *Arid3b* no parece controlar la morfología de la cresta ectodérmica apical a través de un correcto establecimiento del eje dorso-ventral

- Análisis del patrón de expresión de genes implicados en la inducción de la cresta ectodérmica apical.

Se ha propuesto que *Fgf10* expresado en el mesénquima es la molécula encargada de activar *Wnt3/Wnt3a* en el ectodermo de la extremidad. Este gen activa a *Sp8* también en el ectodermo de la extremidad que a su vez promueve la expresión de *Fgf8* en los precursores del AER. Numerosos ensayos de pérdida y ganancia de función en ratón, pollo o pez cebra han demostrado la relevancia de estos genes en la inducción de la cresta ectodérmica apical (Barrow et al., 2003; Kawakami et al., 2004; Kengaku et al., 1998; Min et al., 1998; Ohuchi et al., 1997; Sekine et al., 1999; Soshnikova et al., 2003). *Msx2*, expresado en el ectodermo ventral y a través

de una vía de señalización paralela dependiente de BMPs, es otro colaborador implicado en el proceso de inducción del AER (Pizette et al., 2001).

En embriones mutantes de falta de función *Arid3b*<sup>-/-</sup> de estadio E10.5 se llevaron a cabo hibridaciones *in situ* en secciones de parafina con las sondas de *Fgf10* (n=2), *Sp8* (n=2) y *Msx2* (n=2). Los resultados obtenidos mostraron que no existían alteraciones aparentes ni en el patrón ni en el nivel de expresión de estos genes en relación al control (Fig. 51).

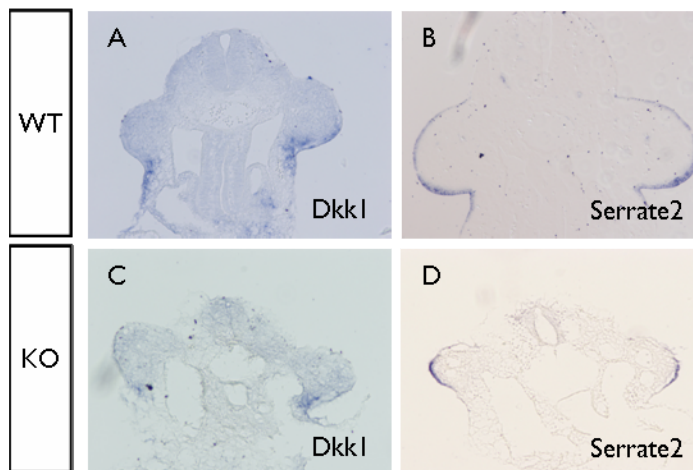


**Figura 51:** Embriones *Arid3b*<sup>-/-</sup> no evidencian anomalías en el patrón de expresión de genes implicados en la vía de inducción de la cresta ectodérmica apical. A-C) Hibridación *in situ* en secciones con las sondas especificadas en embriones control. D-F) Hibridación *in situ* en secciones con las sondas especificadas en embriones *Arid3b*<sup>-/-</sup>.

- Análisis del patrón de expresión de genes implicados en la morfología y homeostasis celular de la cresta ectodérmica apical.

La vía de Notch, implicada en numerosos procesos biológicos, también aparece involucrada en la formación de la cresta ectodérmica apical. *Serrate2/jagged2*, gen que codifica para un ligando de esta vía, se expresa en el AER y el mutante de pérdida de función de este gen presenta un evidente fenotipo en la morfología de esta estructura (Francis et al., 2005; Jiang et al., 1998; Pan et al., 2005; Sidow et al., 1997). Por otro lado DKK1, inhibidor secretado de la vía de Wnts se expresa en el ectodermo distal así como el mesénquima en embriones de ratón de E10.5. Tanto los diferentes mutantes de falta de función de este gen, como los ensayos en pollo, han evidenciado la implicación de *Dkk1* en la correcta formación del AER (Adamska et al., 2003; Adamska et al., 2004; Grotewold and Ruther, 2002; MacDonald et al., 2004; Mukhopadhyay et al., 2001).

Se llevaron a cabo hibridaciones *in situ* en secciones de parafina en embriones de ratón con sondas específicas para los genes *Serrate2* (n=2) y *Dkk1* (n=2). No se observó variación en los niveles de expresión de estos genes en ninguno de los ejemplares (Fig. 52).



**Figura 52:** *Dkk1* y *Serrate2*, implicados en la correcta formación del AER, presentan patrones de expresión similares en embriones *Arid3b*<sup>-/-</sup> y en sus respectivos controles. A, B) Hibridación *in situ* en secciones con las sondas especificadas en embriones control. C, D) Hibridación *in situ* en secciones con las sondas especificadas en embriones *Arid3b*<sup>-/-</sup>.

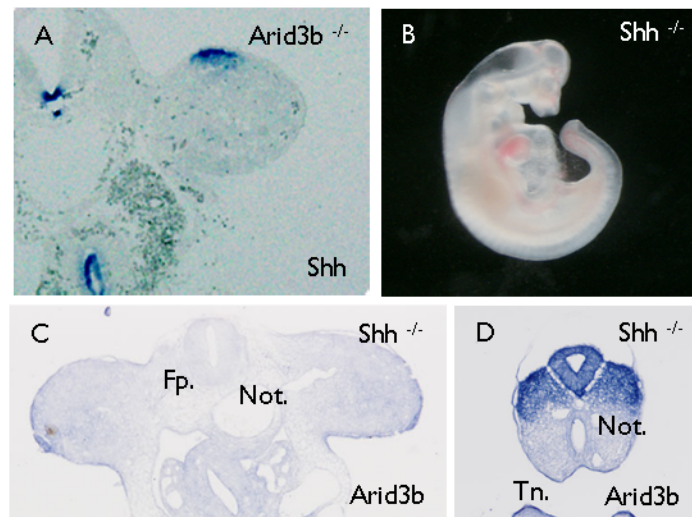
- Análisis del patrón de expresión de *Shh*

Los patrones de expresión de *Shh* y *Arid3b* solapan en ciertas regiones en el embrión de pollo y de ratón. Ambos genes se expresan fuertemente en estructuras tales como la notocorda así como en el floorplate. SHH es una molécula secretada que se expresa en altos niveles en la ZPA y que controla el establecimiento del eje antero-posterior así como el número y la identidad de los dígitos. El solapamiento en algunas regiones del patrón de expresión de *Shh* y *Arid3b* podía sugerir una posible interacción genética entre ambos.

Se realizó una hibridación *in situ* en secciones de embriones mutantes *Arid3b*<sup>-/-</sup> de estadio E10.5 utilizando la sonda de *Shh*. En estos especímenes no se detectaron anomalías evidentes en el patrón de expresión de este gen (n=2) en ninguna de las estructuras del embrión. Para descartar la posibilidad de que fuese *Shh* el gen encargado de regular a *Arid3b*, se realizaron hibridaciones *in situ* en secciones de un embrión *Shh*<sup>GFPCre/GFPCre</sup> (Harfe et al., 2004) de estadio E10 con la sonda de *Arid3b*. En este espécimen se pudo observar una ausencia de expresión de *Arid3b* en el floorplate y notocorda a excepción de las regiones más caudales. Sin embargo, no se detectaron cambios en el patrón de expresión de *Arid3b* en el primordio de la extremidad (Fig. 53).

En el análisis de marcadores implicados en el desarrollo de la extremidad de vertebrados, en muestras de ratón y pollo pertenecientes a ensayos de ganancia y pérdida de función de *Arid3b*, no se observaron alteraciones en su patrón de expresión en la extremidad. Estos resultados sugerían que el proceso afectado durante la formación del AER en estos especímenes, no estaba relacionado con la inducción o la formación de un correcto patrón, sino que podría tratarse de un mecanismo celular básico como por ejemplo supervivencia, proliferación, morfología o adhesión. Para analizar si los fenotipos observados pudieran ser debidos a anomalías en la homeostasis celular se llevaron a cabo estudios de proliferación y apoptosis en los experimentos de ganancia y pérdida de función tanto en pollo, como en ratón. Los resultados se resumen a continuación.





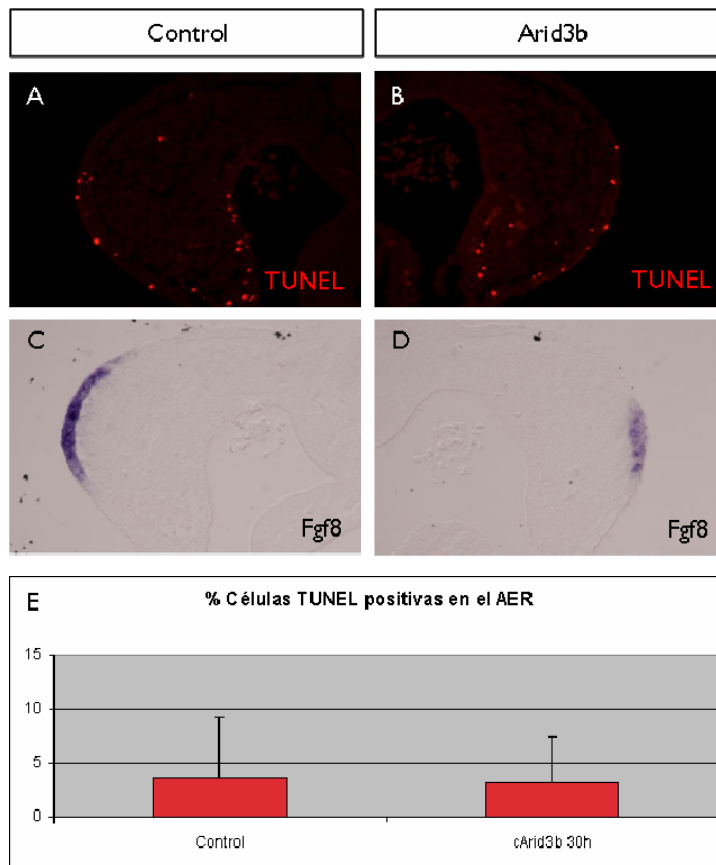
**Figura 53:** A) Hibridaciones *in situ* en secciones transversales de especímenes *Arid3b*<sup>-/-</sup> con la sonda de *Shh* muestran una expresión normal de este gen en estos embriones. B) El mutante de *Shh* a E10.5 presenta un fenotipo evidente en esa etapa de desarrollo. C) *Arid3b* se expresa con normalidad en primordios de la extremidad de ejemplares *Shh*<sup>-/-</sup> pero no se detecta en el floorplate (Fp.) ni en la notocorda (Not.) de la región anterior del embrión. D) En la región posterior *Arid3b* se expresa con normalidad en la totalidad del tubo neural (Tn.) y en la notocorda (Not.).

### **1.5.2. Estudio del papel de *Arid3b* en la morfogénesis del AER. Estudios de proliferación y muerte en la cresta ectodérmica apical de embriones de pollo electroporados**

Se analizaron los niveles de proliferación y muerte celular en la cresta ectodérmica apical en embriones de pollo electroporados con el plásmido de sobreexpresión de la forma wt de *Arid3b* y en embriones electroporados con los plásmidos de sobreexpresión de las formas dominantes negativas. Con el fin de delimitar la cresta ectodérmica apical, tanto en los primordios electroporados como en los controles, se realizaron hibridaciones *in situ* en secciones de parafina con la sonda de *Fgf8* en las muestras manipuladas. Además en otro conjunto de secciones se llevaron a cabo ensayos inmunohistoquímicos con el anticuerpo anti-GFP para identificar las células electroporadas. Aunque los resultados finales vienen resumidos a continuación, la totalidad de los datos obtenidos pueden ser consultados en la tabla suplementaria la dentro del apartado Material suplementario.

- Apoptosis en el AER de embriones de pollo electroporados con el plásmido de sobreexpresión de la forma wt de *Arid3b*.

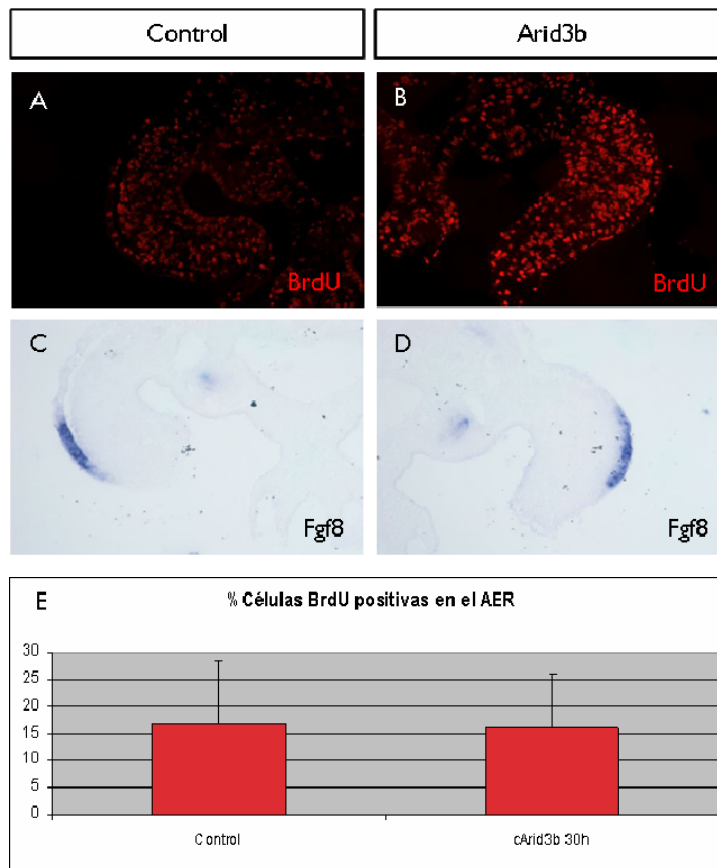
Se electroporaron embriones de pollo de estadio 10-11HH y se recogieron a 30 horas de incubación (n=3). Se llevó a cabo un ensayo de TUNEL en secciones de parafina y se procedió al recuento de las células positivas situadas en la cresta ectodérmica apical tanto de los primordios electroporados como en los contralaterales. El resultado de estos experimentos indicó que no existía una variación significativa en el porcentaje de células apoptóticas en los AERs de los primordios electroporados respecto a los controles (Fig. 54).



**Figura 54:** Estudio de apoptosis (TUNEL) en AERs de primordios de embriones electroporados con *Arid3b* y recogidos a 30 horas postelectroporación. A) Ensayo de TUNEL en una sección del primordio no electroporado. B) Ensayo de TUNEL en una sección del primordio electroporado con la forma wt de *Arid3b* y recogido a las 30 horas. C y D) Hibridación *in situ* con la sonda de *Fgf8* en secciones consecutivas a las anteriores. E) No se detectaron diferencias significativas con respecto a los primordios contralaterales ( $p \geq 0,05$ ).

- Proliferación en el AER de embriones de pollo electroporados con el plásmido de sobreexpresión de la forma wt de *Arid3b*.

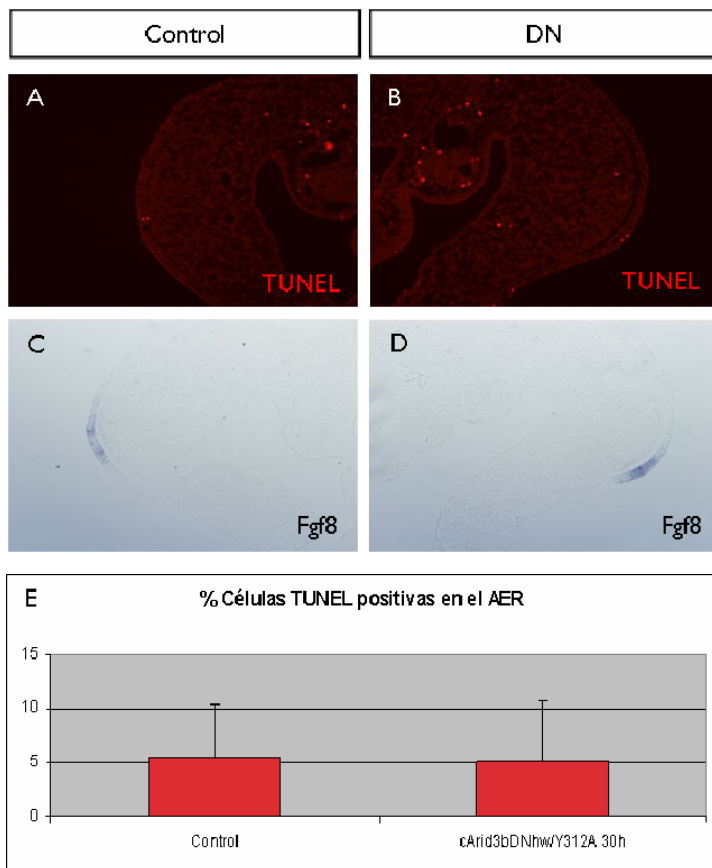
Embriones de pollo de estadio 10-11HH fueron electroporados y recogidos a 30 horas post-electroporación (n=3). Previamente a la recolección de los embriones se inyectó BrdU a 5mg/l a los especímenes electroporados y se incubaron durante 30 minutos. En los embriones elegidos se llevó a cabo la detección del BrdU incorporado y se contaron las células positivas situadas en la cresta ectodérmica apical en los primordios electroporados y en sus respectivos controles. No se detectó una alteración en los porcentajes de células proliferativas en los AERs de los primordios electroporados en comparación con los controles (Fig. 55).



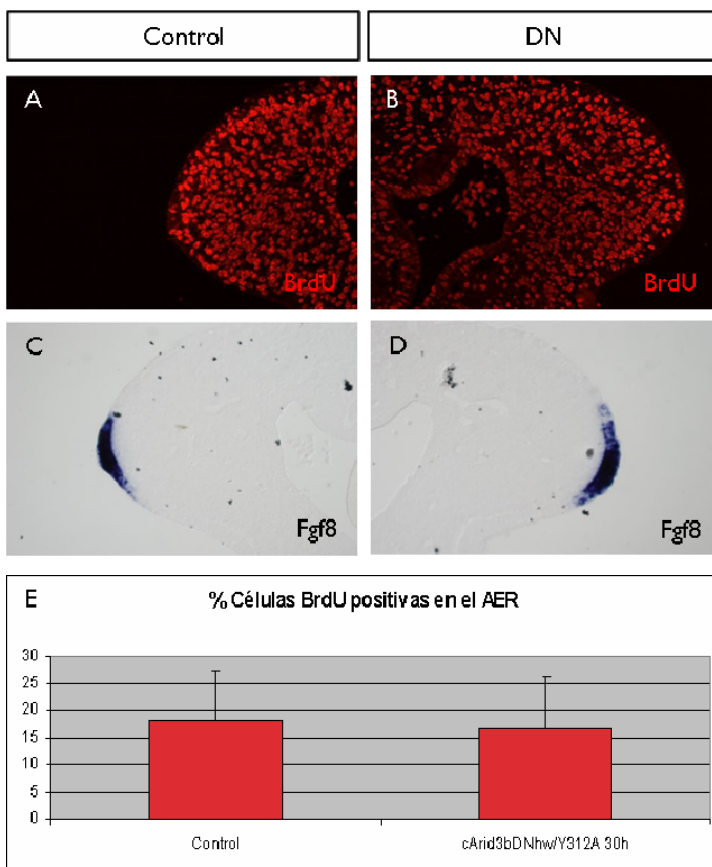
**Figura 55:** Estudio de proliferación celular (BrdU) en AERs de primordios de embriones electroporados con *Arid3b* y recogidos a 30 horas postelectroporación. A) Células BrdU positivas en una sección del primordio no electroporado. B) Ensayo de proliferación en una sección del primordio electroporado con la forma wt de *Arid3b* y recogido a las 30 horas. C y D) Hibridación *in situ* con la sonda de *Fgf8* en secciones consecutivas a las anteriores. E) No se detectaron diferencias significativas con respecto a los primordios contralaterales ( $p \geq 0,05$ ).

En resumen, los ensayos en embriones electroporados con el plásmido de sobreexpresión de *Arid3b* indicaron que los niveles de muerte y proliferación en estos especímenes son comparables a los detectados en primordios control.

- Apoptosis en el AER de embriones de pollo electroporados con el plásmido de sobreexpresión de las formas dominantes negativas de *Arid3b*. Como se observó que los fenotipos detectados con una u otra forma dominante negativa eran indistinguibles, se electroporaron indistintamente los plásmidos cArid3b<sub>DN<sup>hw</sup></sub> y cArid3b<sub>DN<sup>Y312A</sup></sub> en embriones de pollo de estadio 10-11HH y se recogieron a diferentes tiempos post-electroporación, 30 y 72 horas. Los embriones con alta expresión de GFP fueron escogidos preferentemente en ensayos a tiempos cortos (30 horas) y especímenes con fenotipo evidente en el AER fueron seleccionados a 72 horas. Sobre dichas muestras se realizó un estudio de apoptosis mediante TUNEL y se computaron las células apoptóticas del AER de los primordios manipulados y de sus controles. Con los resultados que se obtuvieron a 30 horas post-electroporación ( $n=3$ ), se pudo concluir que no existían diferencias en el porcentaje de células TUNEL-positivas en los AERs de los primordios electroporados respecto a los primordios contralaterales a estos tiempos de incubación (Fig. 56). Sin embargo los datos derivados de los ensayos realizados a 72 horas post-electroporación ( $n=3$ ) indicaron que los AERs de los primordios electroporados presentaban unos niveles prácticamente indetectables de muerte celular frente a los niveles normales observados en los controles (Fig. 58).

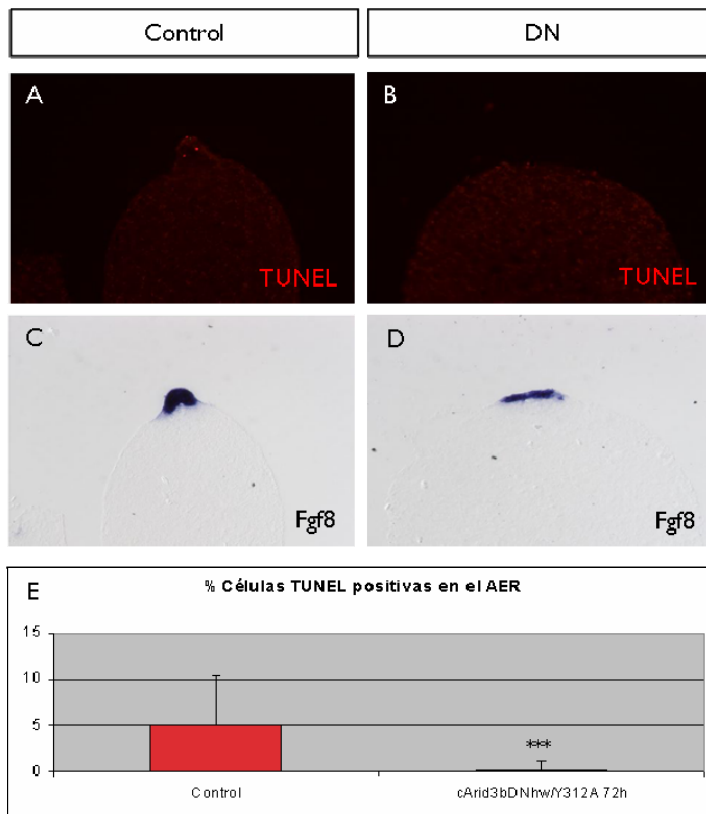


**Figura 56:** Estudio de apoptosis (TUNEL) en AERs de primordios de embriones electroporados con formas dominantes negativas de *Arid3b* y recogidos a 30 horas postelectroporación. A) Ensayo de TUNEL en una sección del primordio no electroporado. B) Ensayo de TUNEL en una sección del primordio electroporado con formas dominantes negativas de *Arid3b* y recogido a las 30 horas. C y D) Hibridación *in situ* con la sonda de *Fgf8* en estas secciones. E) No se detectaron diferencias significativas con respecto a los primordios contralaterales ( $p \geq 0,05$ ).

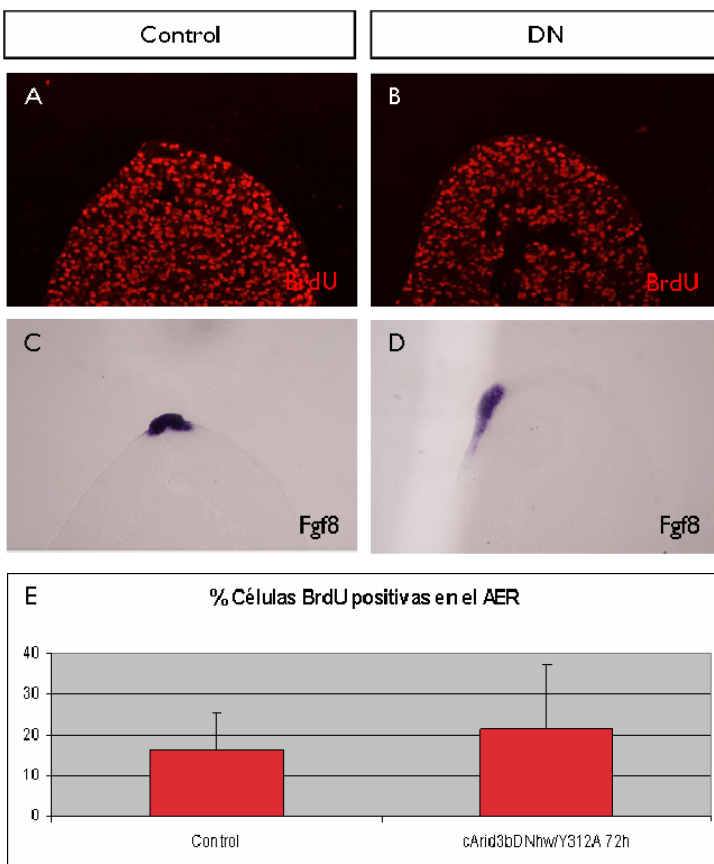


**Figura 57:** Estudio de proliferación celular (BrdU) en AERs de primordios de embriones electroporados con formas dominantes negativas de *Arid3b* y recogidos a 30 horas postelectroporación. A) Proliferación celular en una sección del primordio no electroporado. B) Células BrdU positivas en una sección del primordio electroporado con formas dominantes negativas de *Arid3b* y recogido a las 30 horas. C y D) Hibridación *in situ* con la sonda de *Fgf8* en secciones consecutivas a las anteriores. No se detectaron diferencias significativas con respecto a los primordios contralaterales ( $p \geq 0,05$ ).





**Figura 58:** Estudio de apoptosis (TUNEL) en AERs de primordios de embriones electroporados con formas dominantes negativas de *Arid3b* y recogidos a 72 horas postelectroporación. A) Células TUNEL-positivas en una sección del primordio no electroporado. B) Ensayo de apoptosis en una sección del primordio electroporado con formas dominantes negativas de *Arid3b* y recogido a las 72 horas. C y D) Hibridación *in situ* con la sonda de *Fgf8* en estas secciones. E) Los niveles de muerte celular en los primordios electroporados son mucho menores con respecto a los primordios contralaterales ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 59:** Estudio de proliferación celular (BrdU) en AERs de primordios de embriones electroporados con formas dominantes negativas de *Arid3b* y recogidos a 72 horas postelectroporación. A) Células BrdU-positivas en una sección del primordio no electroporado. B) Ensayo de proliferación en una sección del primordio electroporado con formas dominantes negativas de *Arid3b* y recogido a las 72 horas. C y D) Hibridación *in situ* con la sonda de *Fgf8* en secciones consecutivas a las anteriores. E) No se detectaron diferencias significativas con respecto a los primordios contralaterales ( $p \geq 0,05$ ).

- Proliferación en el AER de embriones de pollo electroporados con el plásmido de sobreexpresión de las formas dominantes negativas de cArid3b. Embriones de pollo de estadio 10-11HH fueron electroporados con las construcciones cArid3b<sub>DNhW</sub> y cArid3b<sub>DNY312A</sub> y recogidos a diferentes tiempos post-electroporación, 30 horas y 72 horas. A 30 horas se seleccionaron muestras con altos niveles de GFP en el ectodermo y a 72 horas se escogieron embriones que visualmente mostraban fenotipo en la cresta ectodérmica apical. Posteriormente se llevó a cabo el ensayo de proliferación mediante detección de BrdU incorporado. Se contaron las células proliferativas pertenecientes al AER, tanto de los primordios electroporados, como en los primordios control. El resultado de los ensayos a tiempos cortos no reveló una variación en los niveles de proliferación estadísticamente significativa (Fig. 57). A 72 horas las células de la cresta ectodérmica apical de los primordios electroporados mostraron un ligero incremento en la tasa proliferativa, sin embargo tras el análisis estadístico se determinó que no era significativo (Fig 59).

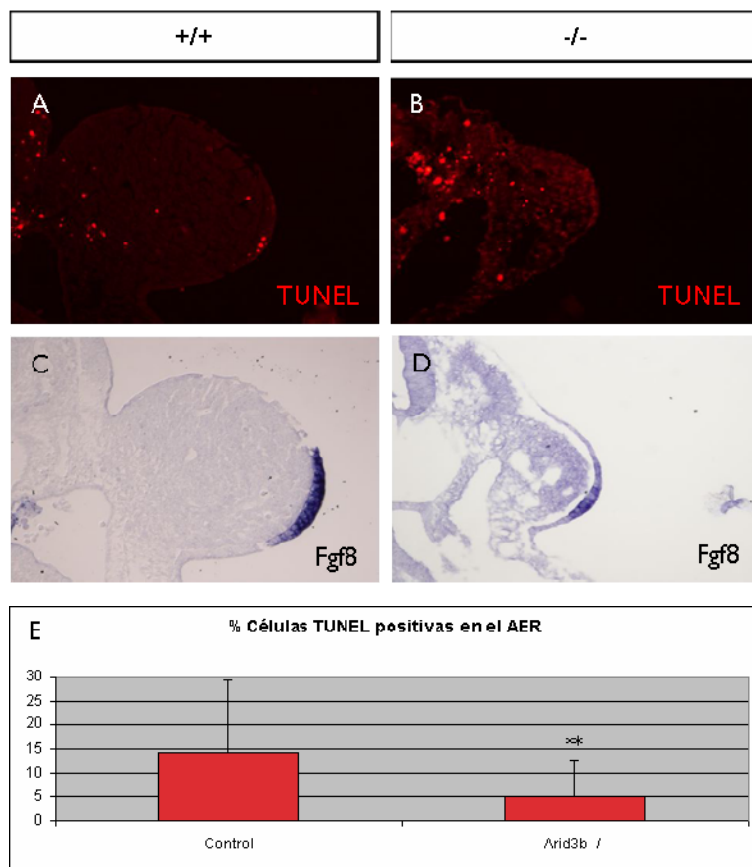
En conclusión, se puede determinar que los niveles de muerte y proliferación observados en el AER de embriones electroporados con las construcciones cArid3b<sub>DNhW</sub> y cArid3b<sub>DNY312A</sub> a 30 horas post-electroporación son semejantes a los detectados en las muestras control. Esto sugiere que a tiempos cortos, en etapas cercanas a la formación del AER, los embriones electroporados no muestran ninguna variación en la tasa proliferación/muerte. Sin embargo, a tiempos largos (72 horas), los niveles de muerte en la cresta ectodérmica apical de los embriones electroporados están claramente reducidos. Tras el análisis de estos datos, y teniendo en cuenta la dinámica de aparición del fenotipo, parece que la muerte y proliferación celular no son los causantes de las anomalías observadas en la cresta ectodérmica apical de los ensayos de ganancia y pérdida de función en el embrión de pollo. Asimismo, las variaciones observadas a 72 horas podrían resultar la consecuencia, y no la causa, de un defecto en la maduración o morfogénesis del AER producido con anterioridad.

### **1.5.3. Estudio del papel de Arid3b en la morfogénesis del AER. Estudios de proliferación y muerte en la cresta ectodérmica apical de embriones mutantes Arid3b<sup>-/-</sup>**

De manera similar al pollo, se llevó a cabo un estudio de los valores de apoptosis y proliferación en la cresta ectodérmica apical de embriones mutantes homocigotos Arid3b<sup>-/-</sup>. Los resultados finales vienen resumidos en este apartado, sin embargo la totalidad de los datos obtenidos pueden ser consultados en la Tabla suplementaria I de la sección Material suplementario.

- Apoptosis en el AER de embriones mutantes homocigotos Arid3b<sup>-/-</sup>. A partir de embriones Arid3b<sup>-/-</sup> de estadio E10.5 (n=3) y de sus respectivas muestras control (n=3), se realizaron secciones consecutivas para dos técnicas diferentes. En parte de estas secciones se realizó un ensayo de TUNEL tal y como se describe en el apartado Materiales y Métodos. En el resto de secciones, y para poder determinar la localización exacta de la cresta ectodérmica apical, se llevó a cabo una hibridación *in situ* en secciones con la sonda de *Fgf8*. Se procedió al recuento de células TUNEL-positivas en el AER tanto de embriones como de los

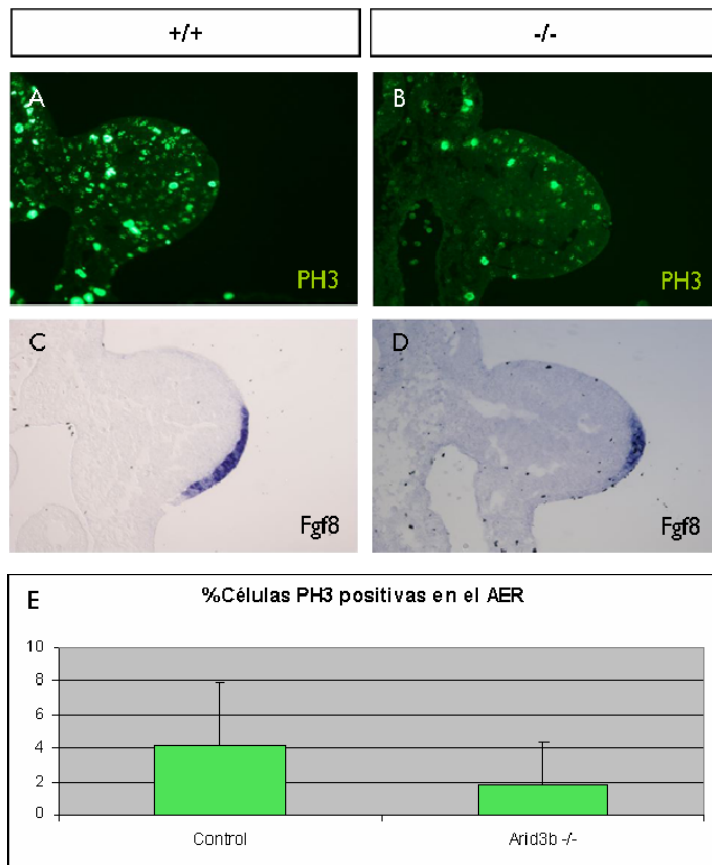
controles y se concluyó que los especímenes mutantes presentaban un 64% menos de muerte que los individuos control (Fig. 60). Sorprendentemente, cabe destacar que, la inmensa mayoría de los tejidos de los embriones *Arid3b*<sup>-/-</sup> de estadio E10.5 presentaban niveles de apoptosis muy superiores comparados con las muestras control.



**Figura 60:** Estudio de apoptosis (TUNEL) en AERs de embriones *Arid3b*<sup>-/-</sup>. A y C) Secciones consecutivas de embriones wt control en las que se ha llevado a cabo un ensayo de TUNEL y una hibridación *in situ* con la sonda de *Fgf8*. B y D) Secciones consecutivas de embriones *Arid3b*<sup>-/-</sup> en las que se ha realizado un ensayo de muerte celular y una hibridación *in situ* con la sonda de *Fgf8*. E) Este parámetro se encuentra significativamente disminuido en estos ejemplares con respecto a los especímenes control ( $p \leq 0,05$ ).

- Proliferación en el AER de embriones mutantes homocigotos *Arid3b*<sup>-/-</sup>. En embriones *Arid3b*<sup>-/-</sup> de estadio E10.5 (n=3) y en embriones control (n=3) se realizaron ensayos de proliferación con fosfohistona-3 (PH3). Como método para establecer la ubicación del AER se realizó una hibridación en secciones con la sonda de *Fgf8*. Se contaron todas las células PH3-positivas situadas en la cresta ectodérmica apical de estos especímenes y se pudo concluir que los embriones mutantes mostraban un 56% menos de proliferación celular que sus homólogos control (Fig. 61). Este defecto en proliferación parece producirse, además en el mesénquima de la extremidad y otras estructuras.

De estos resultados se pudo deducir que existe un descenso tanto en la tasa de proliferación celular como de muerte celular en embriones mutantes *Arid3b*<sup>-/-</sup> respecto a los controles en el AER. Sin embargo la relación muerte/proliferación mantienen valores similares a los observados en las muestras control, indicando una preservación en cuanto al equilibrio celular se refiere, al menos a tiempos cortos.



**Figura 61:** Estudio de proliferación celular (PH3) en AERs de embriones Arid3b<sup>-/-</sup>. A y C) Secciones consecutivas de embriones wt control en las que se observan las células PH3-positivas del AER y en las que se ha realizado una hibridación *in situ* con la sonda de *Fgf8*. B y D) Secciones consecutivas de embriones Arid3b<sup>-/-</sup> en las que se ha realizado un ensayo de muerte celular y una hibridación *in situ* con la sonda de *Fgf8*. E) Este parámetro se encuentra significativamente disminuido en estos ejemplares con respecto a los especímenes control ( $p \leq 0,05$ ).

Estos datos sugieren que el fenotipo observado en la cresta ectodérmica apical de embriones mutantes no es el producto de una anomalía en la relación muerte/proliferación de las células que componen el AER. Sugerimos que la disminución de los valores absolutos podría ser un reflejo del fenotipo general del mutante.

#### **1.5.4. Estudio del papel de Arid3b en la morfogénesis y estructuración del AER: morfología celular, adhesión y lámina basal**

Los resultados expuestos en los apartados anteriores parecen descartar alteraciones en formación de patrón dorso-ventral, en la inducción del AER o en el balance entre la proliferación y muerte celular, como mecanismos primarios causantes del fenotipo en el AER observado tanto en los mutantes Arid3b<sup>-/-</sup> como en los embriones de pollo electroporados. Una vez excluidas dichas posibilidades pasamos a analizar otras características celulares como pueden ser la morfología celular, la organización del citoesqueleto, propiedades de adhesión y la interacción de la célula con su lámina basal. Este estudio se realizó principalmente en el contexto de la pérdida de función del gen, tanto en embriones de ratón mutantes homocigotos Arid3b<sup>-/-</sup>, como en embriones de pollo electroporados con las formas dominantes negativas de Arid3b y recogidos a 72h/80h.

#### **1.5.4.1. Estructura del AER y morfología celular**

##### **1.5.4.1.1. Morfología y contorno celular:**

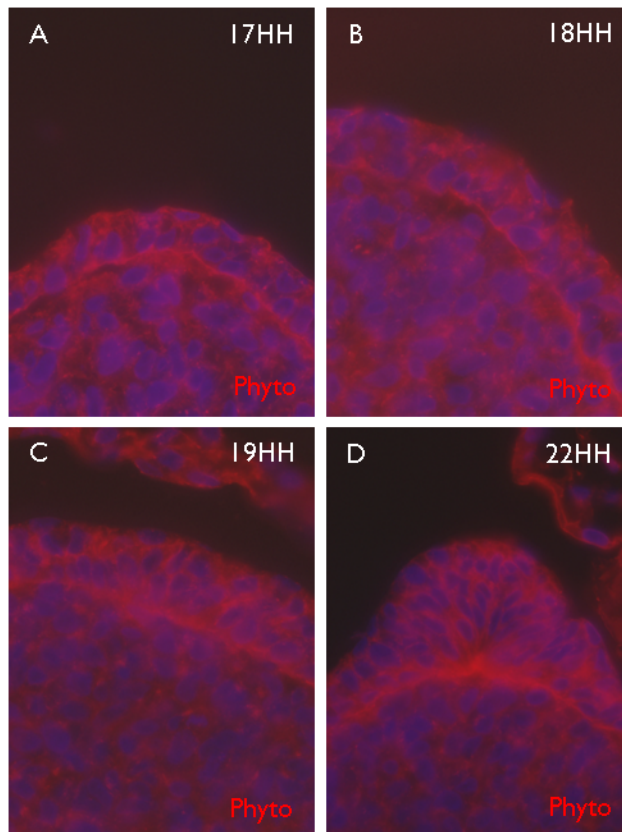
- Fitohemaglutinina (White Germ Agglutinin):

La membrana celular es una estructura laminar compuesta principalmente por un bicapa lipídica y por proteínas. Con cierta frecuencia los fosfolípidos y las proteínas que constituyen la membrana plasmática aparecen unidos covalentemente tanto a oligosacáridos como polisacáridos que constituyen el glicocáliz. La Fitohemaglutinina (WGA) es una lectina de origen vegetal que reconoce, con alta especificidad, algunos componentes glucoproteicos de la membrana celular. Por este motivo, la WGA resulta una herramienta poderosa a la hora de marcar el contorno de la célula.

Se llevaron a cabo tinciones con WGA en embriones de pollo sin manipular a distintos estadios así como en especímenes electroporados con las construcciones *cArid3b<sub>DNRW</sub>* y *cArid3b<sub>DNY312A</sub>* y en embriones mutantes homocigóticos *Arid3b<sup>-/-</sup>* con sus respectivos controles.

En los primordios de pollo no manipulados de estadio 16 o 17 HH se pudo observar que la lectina se unía específicamente a todo el ectodermo y peridermo pero sin delimitar totalmente el contorno de las células (Fig. 62). A medida que el AER va alcanzando una mayor madurez la fitohemaglutinina marcaba con mayor intensidad la lámina basal y el AER, evidenciando la morfología celular de este centro de señalización con mayor claridad (Fig. 62). A estadio 22 HH, este patrón se mostró definido y delimitado, dibujando con nitidez el contorno de las células de la cresta ectodérmica, mientras que en el resto del ectodermo se observó un patrón difuso y poco definido. El AER de este espécimen presentaba una morfología de epitelio pseudoestratificado en forma de abanico con células posicionadas a tres o cuatro alturas. Además mostró un punto de unión localizado en una región central-basal en el que las membranas plasmáticas de cada una de las células del AER confluían. Se pudo determinar que los mayores niveles de lectina en el AER se concentraban en la membrana plasmática de sus células, especialmente en la región de confluencia descrita (Fig. 62). Los niveles de la WGA en las células mesenquimales fueron muy reducidos en todos los estadios.

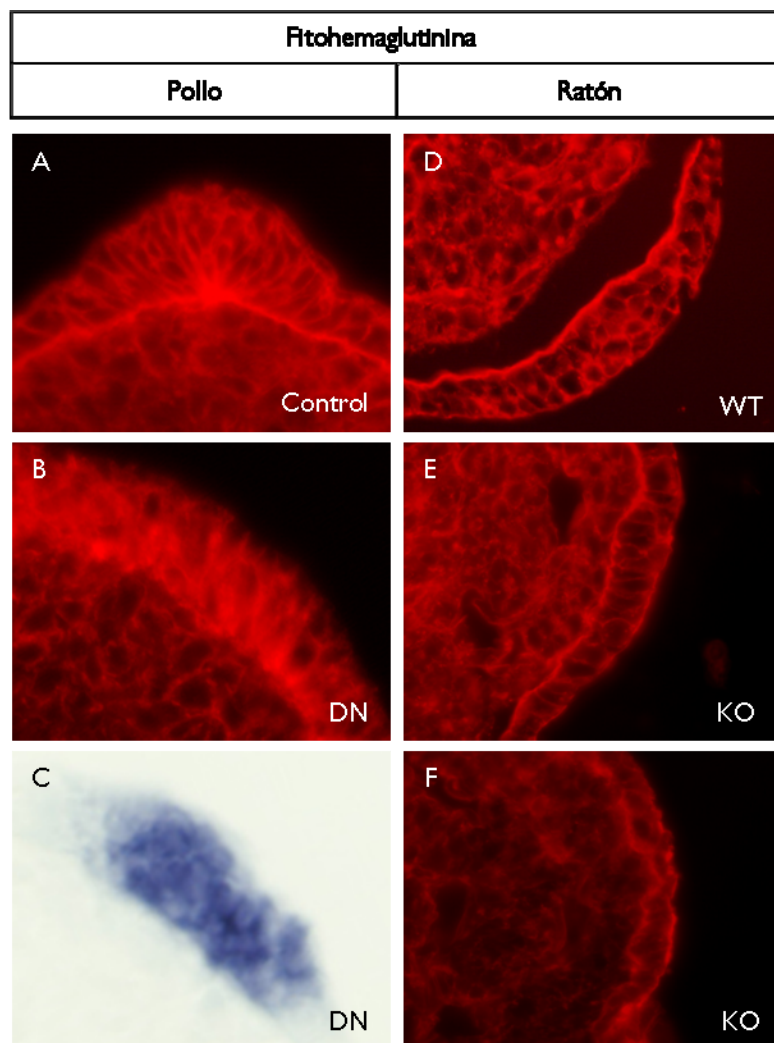
A continuación se estudiaron los primordios control pertenecientes a los embriones electroporados y recogidos a 72 horas. Estos ejemplares (n=2), de un estadio aproximado entre 24 y 27 HH, presentaron un patrón de la lectina similar al observado en el espécimen de 22HH (Fig. 63). En los primordios electroporados con las formas dominantes negativas de *Arid3b* se detectó, en todos los casos (n=2), una cresta ectodérmica apical con morfología aberrante. Las células de este epitelio pseudoestratificado alcanzaban un menor número de alturas, generalmente nunca superior a dos y no presentaban una disposición en abanico ni una región central de confluencia de membranas. Además, la tinción de WGA, más difusa y menos definida reveló un menor grado de madurez en esta estructura (Fig. 63).



**Figura 62:** Tinción con Phytohemglutininina (WGA) en primordios de pollo a diferentes estadios. A-E) Secciones de parafina de primordios de pollo en diferentes etapas de desarrollo teñidas con WGA y Dapi.

En embriones de ratón control se pudieron observar altos niveles de esta lectina en el contorno de las células del ectodermo así como en la lámina basal (Fig. 63). En las células mesenquimales los niveles exhibidos fueron muy inferiores. Los marcajes de WGA, en todos estos primordios (n=2), mostraron un epitelio cuboidal estratificado con dos/tres capas celulares en su parte más alta y una lámina basal razonablemente lineal y uniforme tal y como está descrito. En embriones mutante homocigotos *Arid3b*<sup>-/-</sup> se observaron diferentes resultados. En primer lugar, el dato más evidente es que los contornos delimitados en estas muestras eran más difícilmente perceptibles. En cuanto al número de capas celulares, en un 50% los especímenes analizados (n=4) se detectaron un número de capas similar al control mientras que en el 50% de los casos el embrión lucía un AER con una única capa celular, presentando una segunda capa esporádicamente. En estos especímenes las células evidenciaron una morfología más alargada en algunos puntos del ectodermo y un borde irregular en la lámina basal (Fig. 63).

Los resultados de marcaje de fitohemaglutinina nos permitieron concluir que esta lectina, dentro del primordio, reconoce con mayor afinidad la lámina basal así como las membranas de las células del AER. Además el análisis realizado en embriones controles respecto a los especímenes experimentales muestra un incremento de tinción en AERs con mayor índice de madurez y estructuración.



**Figura 63:** Tinción con Fitohemaglutinina (WGA) en primordios de embriones de pollo y ratón. A) Sección que muestra un AER de pollo no manipulado a cinco días de desarrollo teñido con WGA. La WGA muestra un patrón delimitado y totalmente definido en este AER, identificando claramente la conformación de esta estructura B) Secciones del mismo embrión pero correspondientes al primordio electroporado con una de las formas dominantes negativas de *Arid3b* y recogidas a 72 horas. El patrón de WGA observado en el AER es difuso, mostrando defectos en su conformación. C) Hibridación *in situ* con la sonda de *Fgf8* en una sección consecutiva. D) Tinciones con WGA en secciones de primordios de ratones control que muestran una cresta ectodérmica apical poliestratificada, formada por células cuboidales totalmente estructuradas. E y F) Tinciones similares en secciones de mutantes *Arid3b*<sup>-/-</sup> muestran un AER cuyo patrón de WGA resultó menos definido, presentando un borde más irregular y un mayor número de células con morfología alargada.



- $\beta$ -catenina:

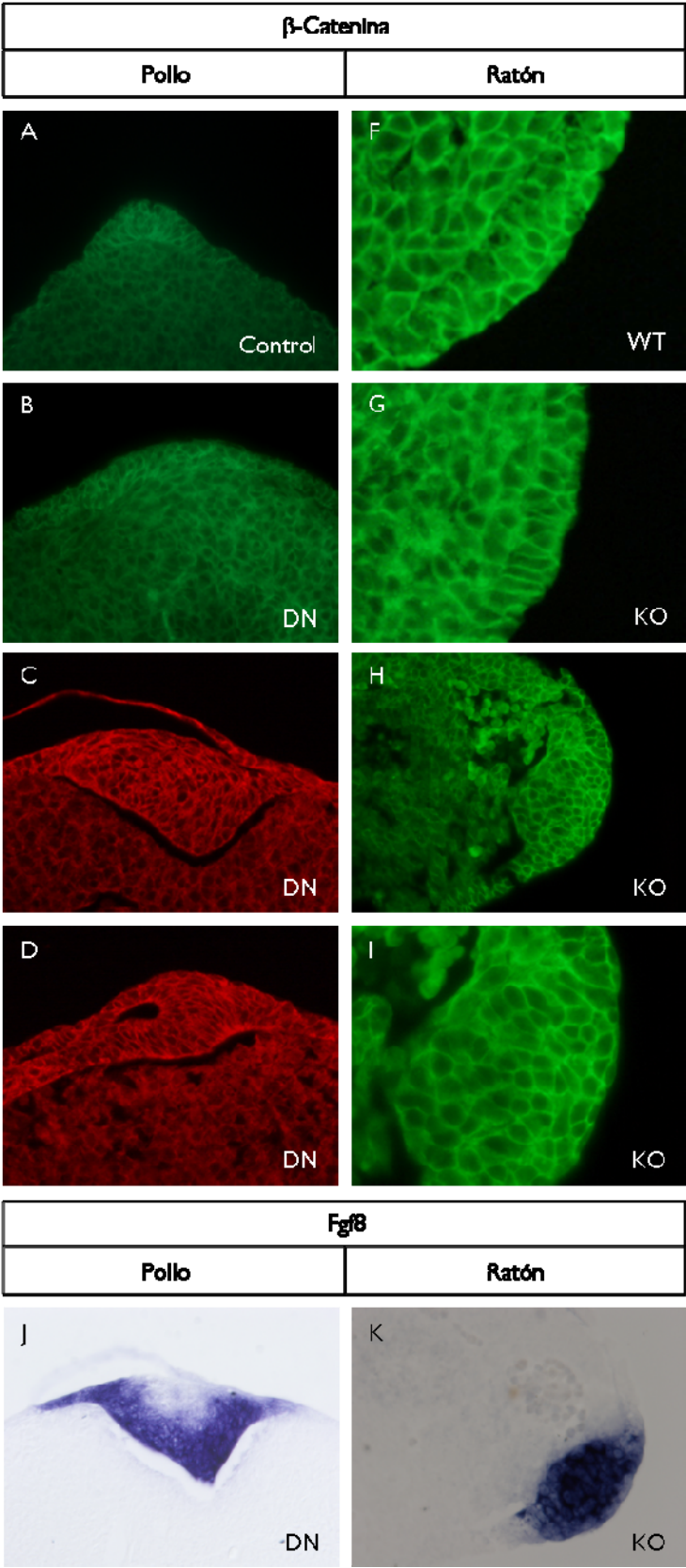
Se ha demostrado que la vía de Wnts es esencial durante la formación de la extremidad de vertebrado (Barrow et al., 2003; Kengaku et al., 1998; Soshnikova et al., 2003). La señalización canónica de esta vía está mediada por la proteína  $\beta$ -catenina. Esta molécula, tras la activación de la vía, es capaz de translocarse al núcleo y formar un complejo implicado en la activación de genes diana. Además,  $\beta$ -catenina forma parte del complejo de adhesión en la superficie celular ya que una fracción importante de dicha proteína se localiza asociada a la membrana plasmática anclada a E-cadherina. El anticuerpo contra  $\beta$ -catenina utilizado en estos experimentos marcaba con gran intensidad y de manera preferente la membrana de cada una de las células, tanto ectodérmicas como mesenquimales, pertenecientes al primordio de ratón y pollo. Esto nos permitió emplear dicha técnica para examinar la morfología de las células así como su organización dentro del AER.

Se recogieron embriones electroporados con las formas dominantes negativas a 72 horas (n=1) y a 80 horas (n=2). Mientras que la cresta ectodérmica del primordio control, en todos los casos, se caracterizaba por poseer un epitelio pseudoestratificado con numerosas alturas celulares y conformación en forma de abanico, los AERs electroporados evidenciaron un fenotipo diferente dependiendo del tiempo de recogida y a su vez distinto de sus respectivos controles (Fig. 64). En el embrión recogido a 72 horas se pudo determinar un AER con un menor grado de estratificación y con morfología anómala, similar al observado en los ensayos con fitohemaglutinina (Fig. 64). No obstante, las crestas ectodérmicas apicales pertenecientes a los especímenes recolectados a 80 horas post-electroporación, mostraban un exagerado número de capas celulares completamente desorganizadas. Dicho AER, de aspecto hiperplásico, no mostraba la típica conformación en abanico propia de este centro de señalización sino una aglomeración celular desestructurada (Fig. 64) que en ocasiones se introducía en el mesénquima. Hibridaciones *in situ* en este ejemplar distinguieron la presencia de *Fgf8* en esta estructura aberrante, a excepción de la parte apical de las zonas donde este AER presentaba un mayor grosor (Fig. 64). Por otro lado y de manera sorprendente, una de estas crestas ectodérmicas apicales poseía una estructura en forma tubular nunca observada en este tipo de tejido (Fig. 64).

Se analizó el patrón de expresión de  $\beta$ -catenina en el primordio de la extremidad de embriones de ratón wt a estadio E9.5-10. Este resultado permitió observar con mayor nitidez dos o tres capas de células cuboidales del epitelio estratificado que forma la cresta ectodérmica apical en el 100% (n=2) de estos especímenes (Fig. 64). En embriones mutantes *Arid3b*<sup>-/-</sup> se observó una única capa celular (dos, en algunas fracciones del ectodermo) en un 50% (n=2) de los casos analizados. En estas muestras también se detectó un mayor porcentaje de células de conformación alargada en diferentes lugares del ectodermo (Fig. 64). Además, en el único espécimen mutante recogido a estadio E11 para este marcador, se observó una cresta ectodérmica apical con un número de capas cercano a diez, sin ningún tipo de organización aparente y que protrusionaba hacia el mesénquima subyacente (fig. 64). Las células integrantes de este AER desestructurado, expresaban niveles



normales de *Fgf8*, tal y como se detecto por hibridación *in situ* en secciones (Fig. 64).



**Figura 64:** Ensayos inmunohistoquímicos con  $\beta$ -catenina en embriones de pollo y ratón nos permiten analizar la morfología de las células. (A) Expresión de  $\beta$ -catenina en secciones de primordios de embrión de pollo sin electroporar. El AER de estos primordios adquiere una conformación de abanico, típica en esta estructura. (B-D) Expresión de  $\beta$ -catenina en secciones de primordios electroporados con formas dominantes negativas de *Arid3b* y recogidos a 72 horas o 80 horas postelectroporación. Los AERs de estos primordios están totalmente desorganizados. (B) AER desestructurado con un menor número de capas celulares en un primordio recogido a 72 horas postelectroporación. (C) AER de estructura aberrante con un número exagerado y anómalo de capas celulares en un primordio electroporado con una de las formas dominantes negativas recogido a 80 horas postelectroporación. (D) Estructura tubular observada en un AER recogido a 80 horas postelectroporación. F-I) Distribución del anticuerpo  $\beta$ -catenina en secciones de primordios de embriones de ratón control (F) y *Arid3b*<sup>-/-</sup> (G-I). F) En especímenes control el AER es una estructura organizada, con 2-3 capas celulares. G) AER desorganizado, con células de morfología alargada y menor número de capas celulares en un espécimen *Arid3b*<sup>-/-</sup>. H) AER totalmente desestructurado con un número de capas aberrante en embrión *Arid3b*<sup>-/-</sup>. I) Magnificación de H. J) Hibridación *in situ* en una sección consecutiva a la mostrada en el panel C con la sonda de *Fgf8*. K) Expresión de *Fgf8* por hibridación *in situ* en una sección consecutiva a la mostrada en el panel H de un ratón mutante *Arid3b*<sup>-/-</sup>.

#### 1.5.4.1.2. Citoesqueleto:

- Faloidina/Actina F:

La actina es una proteína globular que forma los microfilamentos, uno de los tres componentes fundamentales del citoesqueleto y que proporciona morfología y movilidad a la célula eucariota.

Se realizaron tinciones con faloidina en embriones de pollo electroporados con las formas dominantes negativas y recogidos a 80 horas. Se pudo determinar que esta tinción revelaba el citoesqueleto de actina de todas las células del primordio mostrando unos niveles similares tanto en el AER del primordio electroporado como en el control (Fig. 65). No obstante, debido a la estructuración aberrante de estos centros de señalización, el patrón global de esta molécula en el conjunto del AER resultó anormal en todas las secciones de todos los embriones estudiados (n=2) (Fig. 65). Destacamos, en el primordio control, la presencia de altos niveles de actina en la región de confluencia de las membranas de las células integrantes del AER. Dicha región, no está presente en los primordios manipulados.

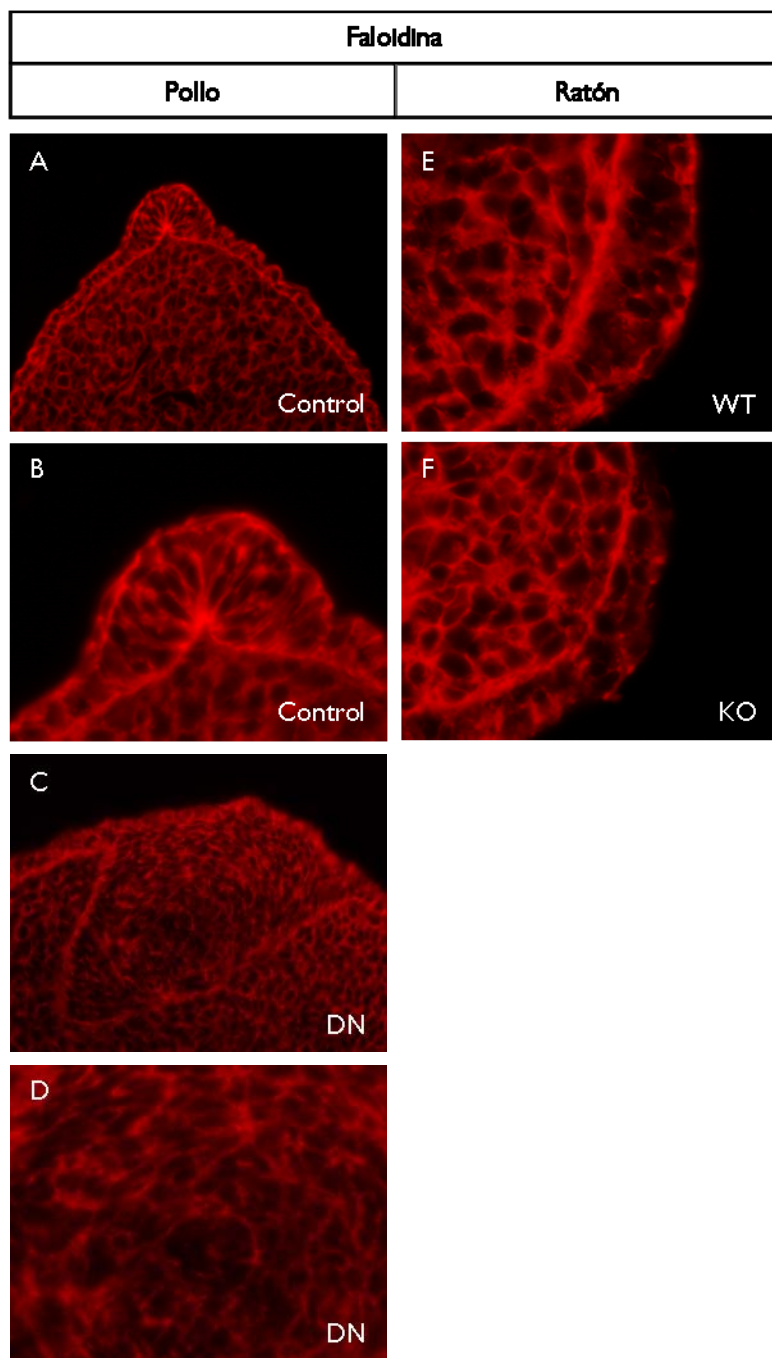
Posteriormente se realizaron tinciones de faloidina en embriones mutantes *Arid3b<sup>-/-</sup>* y se compararon con especímenes control. Se pudo advertir una intensidad comparable en la cresta ectodérmica apical de ambas muestras. Consistentemente con los ensayos realizados en pollo, la desorganización de las células de esta estructura, adoptada por la totalidad de estos especímenes mutantes (n=2), provoca una disposición general anómala de los filamentos de actina.

- $\alpha$ -Tubulina:

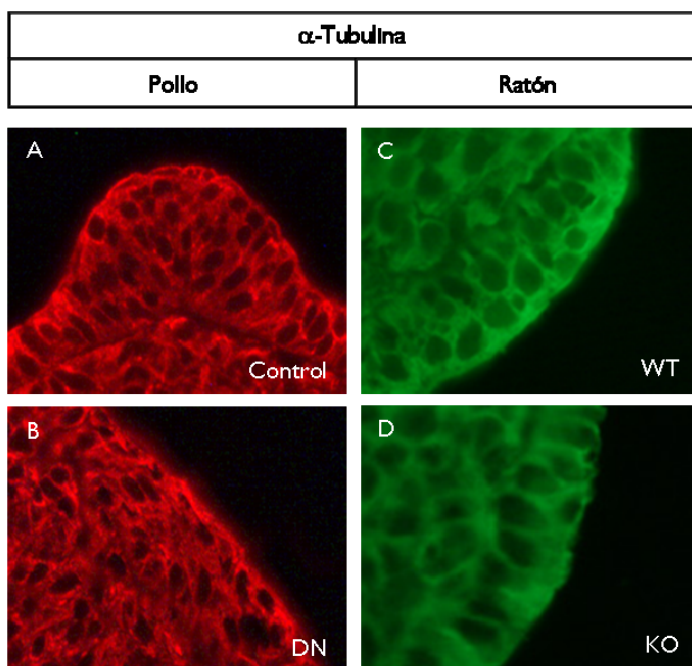
Los microtúbulos, junto con los microfilamentos y los filamentos intermedios, forman el citoesqueleto. Estas estructuras tubulares compuestas por dímeros de  $\alpha$ -tubulina y  $\beta$ -tubulina, están implicadas en procesos tales como el desplazamiento de vesículas de secreción, movimiento de orgánulos y división celular.

Se utilizó un anticuerpo anti- $\alpha$ -tubulina para estudiar los microtúbulos en embriones de pollo electroporados con las formas dominantes negativas (n=2). No mostraron diferencia en los niveles de expresión de  $\alpha$ -tubulina en comparación con el primordio contralateral. Sin embargo la utilización de este anticuerpo puso de nuevo de manifiesto las diferencias morfológicas y estructurales de las células descritas con anterioridad (Fig. 66).

De manera similar se examinó la disposición de los microtúbulos en el AER de embriones de ratón control, así como en mutantes homocigotos *Arid3b<sup>-/-</sup>*. En este análisis y a la resolución observada no se pudo detectar ninguna diferencia en la señal detectada procedente de este componente del citoesqueleto en el 100% de los especímenes analizados (n=2) (Fig. 66).



**Figura 65:** Tinción con faloidina en embriones de pollo y ratón. A y B) Disposición del citoesqueleto de actina en secciones de primordios de embriones de pollo sin electroporar. C, D) Secciones de primordios electroporados con formas dominantes negativas de *Arid3b*, y recogidos a 80 horas, mostraron que la disposición general de los filamentos de actina es anómala. E) Tinción con faloidina en secciones de embriones de ratón control F) En embriones *Arid3b*<sup>-/-</sup>, la distribución general de estos filamentos no es idéntica al control.



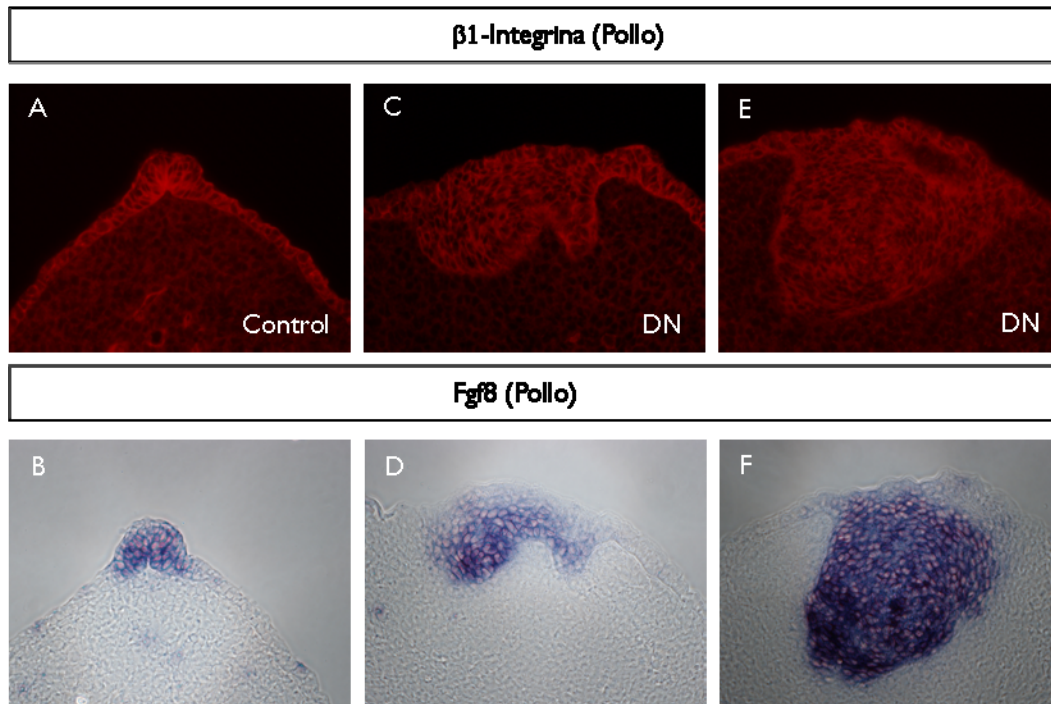
**Figura 66:** Inmunohistoquímica con el anticuerpo contra  $\alpha$ -tubulina en embriones de pollo y ratón. A)  $\alpha$ -tubulina en secciones de primordios de embriones de pollo sin electroporar. B) Secciones en embriones electroporados con formas dominantes negativas de *Arid3b* y recogidos a 72 horas. C) Expresión de  $\alpha$ -tubulina en primordios de embriones de ratón control. D) Secciones en primordios de embriones de ratón *Arid3b*<sup>-/-</sup> con  $\alpha$ -tubulina. Los niveles de esta molécula en los ensayos de pérdida de función son similares a sus respectivos controles, sin embargo su distribución general resultó anómala.

#### 1.5.4.2. Uniones celulares

- $\beta$ 1-integrina:

Las integrinas son una familia heterodimérica de glicoproteínas, implicadas en procesos biológicos tales como agregación plaquetaria, inflamación, función inmune, reparación de tejidos, metástasis celular y migración de tejidos durante la embriogénesis. Estructuralmente todas poseen dos subunidades denominadas alfa y beta, habiéndose identificado por lo menos 20 subunidades alfa y 8 subunidades beta diferentes. Las integrinas se unen a una amplia variedad de proteínas de la matriz extracelular y exhiben diferentes especificidades, dependiendo del tipo de célula en la cual son expresadas. La subunidad  $\beta$ 1-integrina parece mediar las interacciones entre la matriz extracelular y el citoesqueleto y ha sido descrita su presencia en la cresta ectodérmica apical del primordio de la extremidad de pollo (Critchlow and Hinchliffe, 1994).

Se llevaron a cabo tinciones inmunohistoquímicas con el anticuerpo contra  $\beta$ 1-integrina en embriones de pollo electroporados con las formas dominantes negativas y recogidos a 80 horas post-electroporación. Los primordios control mostraron una expresión de esta molécula en todo el ectodermo marcando el contorno de cada una de las células de este tejido, incluidas las del AER (Fig. 67). Aunque se pudo observar unos niveles similares de  $\beta$ 1-integrina en los AERs de los primordios electroporados, la disposición fue aberrante reflejando la desestructuración de este centro de señalización ya observada con otros marcadores. La tinción con  $\beta$ 1-integrina reveló en un 100% de los casos (n=2) un mayor número de capas celulares así como una estructuración aberrante de la cresta ectodérmica apical de estos especímenes (Fig. 67).



**Figura 67:** A, C y E) Inmunohistoquímica con anticuerpo contra  $\beta 1$ -integrina en primordios de embrión de pollo y B, D y F) secciones consecutivas hibridadas con la sonda de *Fgf8*. A) Secciones de primordio de pollo sin manipular muestran la localización de  $\beta 1$ -integrina en la membrana de las células, especialmente del ectodermo. B) Hibridación *in situ* con *Fgf8* en sección consecutiva del espécimen. C y E) Tinción con  $\beta 1$ -integrina muestra la organización anómala de la cresta ectodérmica apical en dos embriones de pollo electroporados con formas dominantes negativas de *Arid3b* y recogidos a 80 horas. D y F) Hibridación *in situ* con la sonda de *Fgf8* en secciones de estos especímenes. El panel D corresponde a una sección consecutiva del panel C y el panel F del E.

- E-Cadherina:

Las uniones adherentes (*zonula adherens*, o *adherens junction*) son uniones intercelulares capaces de anclar células a través de sus filamentos de actina. Las moléculas que median estas uniones son las denominadas cadherinas. Las cadherinas son moléculas de adhesión calciodependientes con amplia distribución durante el desarrollo y en órganos adultos. Estas moléculas son glicoproteínas de membrana cuyas funciones principales residen en proporcionar una adhesión célula-célula selectiva y participar en los procesos de migración celular durante la diferenciación de tejidos. También juegan un papel fundamental en mantener la integridad de las estructuras multicelulares. La E-cadherina (cadherina epitelial) se encuentra en el tejido epitelial embrionario y adulto y su función es mantener la estructura de las capas epiteliales mediante su unión a  $\beta$ -catenina.

El estudio de esta proteína en el primordio de embriones de pollo mostró altos niveles de E-cadherina en la membrana de todas las células del ectodermo de manera uniforme. Con la ayuda de este marcador fuimos capaces de determinar que el ectodermo del primordio de la extremidad es un tejido que presenta un alto

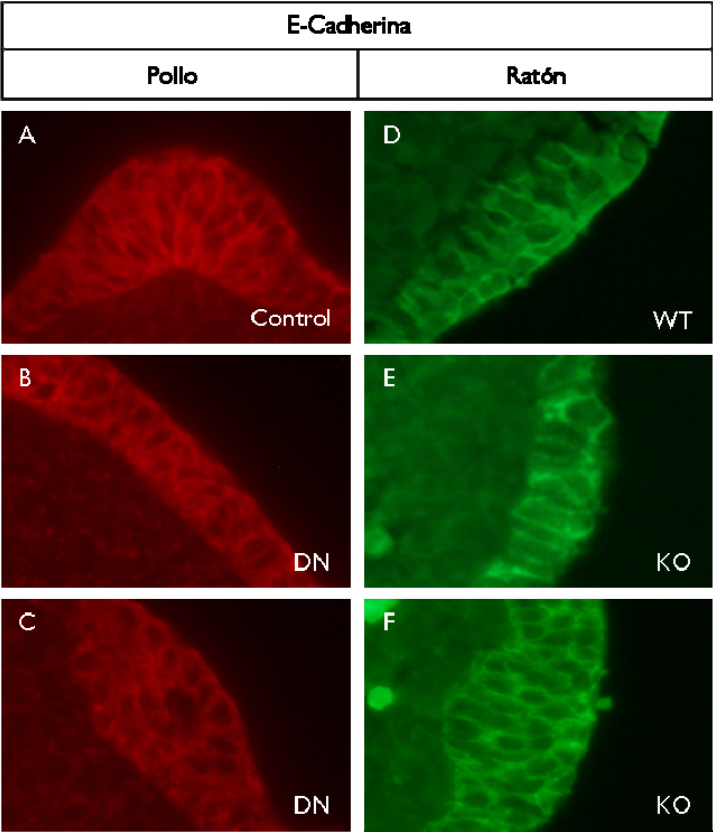


grado de uniones adherentes pero que no existe un enriquecimiento de estas uniones en la cresta ectodérmica apical. La intensidad y la ubicación de E-cadherina en un 100% (n =2) de los embriones electroporados con la forma dominante negativa de *Arid3b* no difirió con respecto a los especímenes control (Fig. 68).

Se analizó el patrón de expresión de E-cadherina en el primordio de embriones de ratón wt. Los resultados revelaron que esta molécula, se disponía en la membrana de todas las células del ectodermo de manera similar al pollo (Fig. 68). En el 100% de los embriones mutantes *Arid3b*<sup>-/-</sup> (n=3) se pudieron observar niveles similares de E-cadherina en el ectodermo del primordio (Fig. 68).

La distribución celular de esta molécula nos ha permitido utilizar dicho marcador para revelar el contorno de las células del AER de los diferentes ejemplares analizados. En los embriones de pollo electroporados (n=2) se obtuvo un espécimen con un menor número de alturas en el AER, sin embargo un caso recogido a 80 horas post electroporación exhibió una cresta ectodérmica apical con un número de alturas superior al normal además de estructuras tubulares en su interior (Fig. 68).

En dos de los embriones de ratón mutantes *Arid3b*<sup>-/-</sup> (n=3) se observó un menor número de capas celulares y una morfología celular que denotaba un menor grado de madurez. Sin embargo en un espécimen (n=3) se encontró una cresta ectodérmica apical con un mayor número de capas celulares (casi el doble de lo esperado) y organización alterada, similar a lo observado con  $\beta$ -catenina.



**Figura 68:** Inmunohistoquímica de E-cadherina en embriones de pollo y ratón. A) La expresión de E-cadherina en secciones de un primordio de pollo sin manipular muestra la morfología del AER en estos especímenes. B) Expresión de E-cadherina en secciones de un AER de embrión electroporado con una de las formas dominantes negativas de *Arid3b* y recogido a 72 horas postelectroporación. Estos AERs muestran una estructura alterada y menor número de capas celulares. C) Estructura tubular en AERs de primordios de embriones recogidos a 80 horas después de electroporar una de las formas dominantes negativas de *Arid3b*. D) Secciones que muestran el patrón de E-cadherina en un primordio de embrión de ratón control. E) Células de morfología alargada en el AER de embriones *Arid3b*<sup>-/-</sup> observada en secciones de primordios de estos especímenes. F) Secciones de un primordio perteneciente a un embrión *Arid3b*<sup>-/-</sup> que muestra un AER desorganizado con un número anómalo de capas celulares.

- Conexina 43:

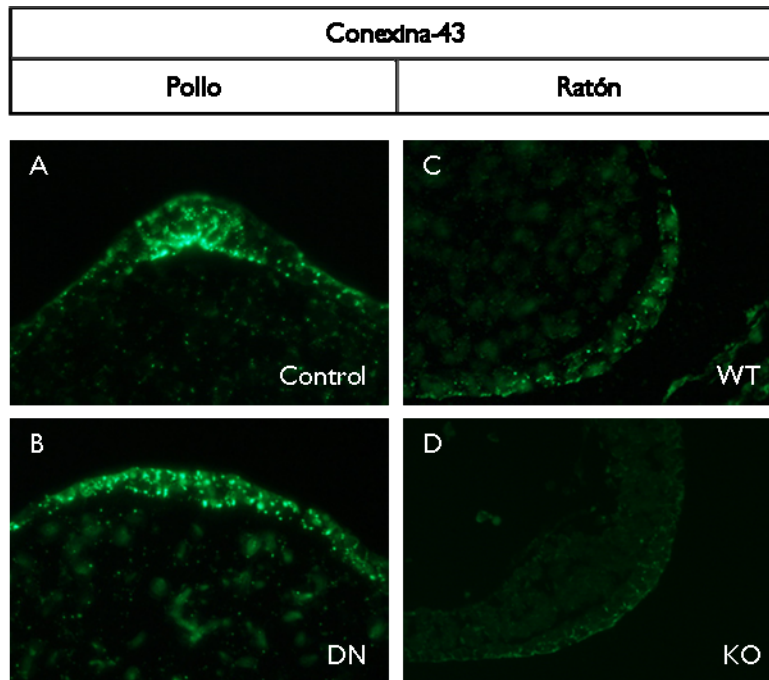
Las uniones comunicantes o *gap junctions* son uniones celulares capaces de permitir el intercambio de moléculas entre los citoplasmas de células adyacentes sin pasar por el espacio extracelular. Estas uniones están formadas por dos hemicanales compuestas a su vez por seis moléculas de conexinas y permiten el intercambio de moléculas de hasta 1000 daltons. Las uniones comunicantes aparecen en numerosas estructuras durante el desarrollo embrionario incluido la cresta ectodérmica apical en el embrión de pollo y ratón (Fallon and Kelley, 1977).

La conexina 43 es un componente de las *gap junctions* y su expresión engloba a un número considerable de estructuras embrionarias (Musil and Goodenough, 1990; Wiens et al., 1995). En el primordio, esta molécula se considera un marcador específico de AER frente al resto de ectodermo, tanto en mamíferos como en aves (Kelley and Fallon, 1976). Asimismo su papel esencial en la formación del AER del embrión de pollo ha sido descrito (Makarenkova and Patel, 1999).

Se analizó el patrón de Conexina 43 en embriones de pollo electroporados con las construcciones cArid3b<sub>DNhW</sub> y cArid3b<sub>DNY312A</sub> y recogidos a 72 horas mediante técnicas inmunohistoquímicas. En el primordio control se determinó que Conexina 43 se expresaba de manera evidente en el ectodermo distal especialmente en la cresta ectodérmica apical. El patrón observado lucía una apariencia punteada con niveles muy intensos, especialmente en la parte basal del AER donde confluyen las membranas plasmáticas de este epitelio (Fig. 69). El primordio electroporado reveló unos niveles de Conexina 43 equivalentes al control sin embargo se observó una disposición diferente (Fig. 70). La región de confluencia de membranas en la parte basal del AER previamente descrita no resulta evidente en los primordios electroporados, por este motivo la expresión de Conexina 43 presenta un aspecto uniforme por todo el AER.

En embriones de ratón silvestres/wt de 9.5-10 se pudo observar, un patrón punteado pero de niveles intensos en el ectodermo del primordio de la extremidad, particularmente en el AER (Fig. 69). Estos niveles de Conexina 43 mostraron un aumento de uniones comunicantes en el AER con respecto al resto del ectodermo. Se analizaron primordios de embriones mutantes Arid3b<sup>-/-</sup> y no se detectaron variaciones en estos especímenes (n=2) con respecto al control.

**Figura 69:** Detección de Conexina 43 en embriones de pollo y ratón. A) Tal y como se observa en secciones de primordios de embriones de pollo sin manipular Conexina 43 se expresa con intensidad en el AER, especialmente en la región de confluencia de las membranas de las células que lo componen, B) Secciones en primordios electroporados con formas dominantes negativas de Arid3b y recogidos a 72 horas mostraron una intensidad equivalente pero una distribución totalmente diferente. C) Expresión de Conexina 43 en secciones de primordios de embriones de ratón control. D) En primordios de embriones de ratón Arid3b<sup>-/-</sup> la localización de esta molécula es diferente al control.



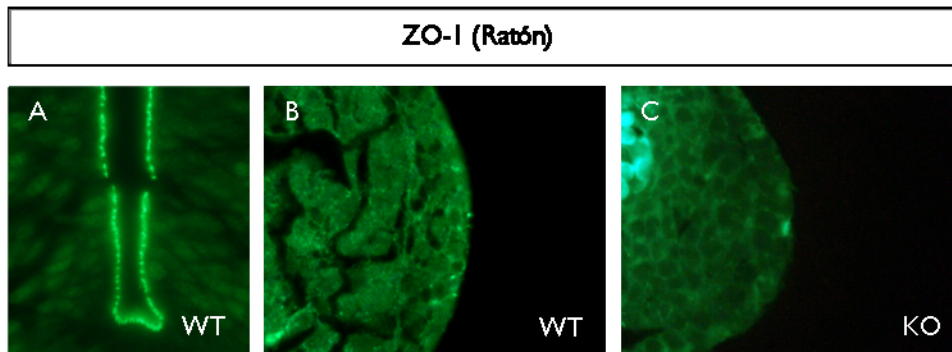
- ZO-I:

Las zonas ocluyentes (*zónula occludens* o *tight junction*) son uniones celulares que impiden el paso de moléculas entre los espacios de las células que lo forman. Estas regiones unen los citoesqueletos de dos células adyacentes formando una barrera impermeable además de conferir un alto grado de compartimentalización al tejido al que pertenecen. Estas uniones son típicas de epitelios polarizados, están presentes en tejidos secretores o de absorción y están formadas principalmente por moléculas como ocludinas, claudinas o ZO-I entre otras.

Se analizó el patrón de expresión de ZO-I en embriones de pollo electroporados con las formas dominantes negativas de Arid3b y recogidos a 72 horas post-electroporación. Aunque se observó un patrón muy sugerente en estructuras como el miotomo o el tubo neural, no se detectó expresión de ZO-I en ninguna región del primordio en la extremidad electroporada ni en el primordio control (Fig. 70).

Se realizó un ensayo inmunohistoquímico con el anticuerpo de ZO-I en embriones de ratón control. Estos especímenes mostraron un patrón similar al observado en pollo, pero además se detectaron bajos niveles de ZO-I en algunas regiones del peridermo que recubre el AER y en las células pertenecientes a las capas más distales de la cresta ectodérmica apical (Fig. 70). Esta expresión resultó evidente pero muy sutil y presentaba un aspecto punteado. En los embriones mutantes Arid3b<sup>-/-</sup> se observó en el 100% de los casos (n=2) que los niveles de ZO-I desaparecían tanto en el primordio de la extremidad como en el resto de estructuras en gran medida y quedaban sustituidos por un patrón de aspecto inespecífico (Fig. 70). Sin embargo este resultado pensamos que podría no ser la causa del fenotipo observado en la cresta ectodérmica apical sino un signo evidente del deterioro del embrión.





**Figura 70:** Inmunohistoquímica con el anticuerpo contra ZO-1 en embriones de ratón. A y B) Secciones en las que se muestra la localización de ZO-1 en la luz del tubo neural (A) y en el AER (B) en embriones de ratón control. C) Secciones de embriones *Arid3b*<sup>-/-</sup> en las que se observa que el patrón de ZO-1 es difícilmente detectable.

#### 1.5.4.3. Lámina basal y matriz extracelular

- Laminina:

La membrana basal es una capa continua, acelular y de espesor variable que se encuentra por debajo de los tejidos epiteliales. Su misión es proporcionar sostén, compartimentalizar y facilitar la filtración molecular pasiva entre los tejidos que separa. La lámina reticularis es una fracción de la membrana basal rica en colágeno tipo IV y VII y en glucoproteínas tales como la laminina.

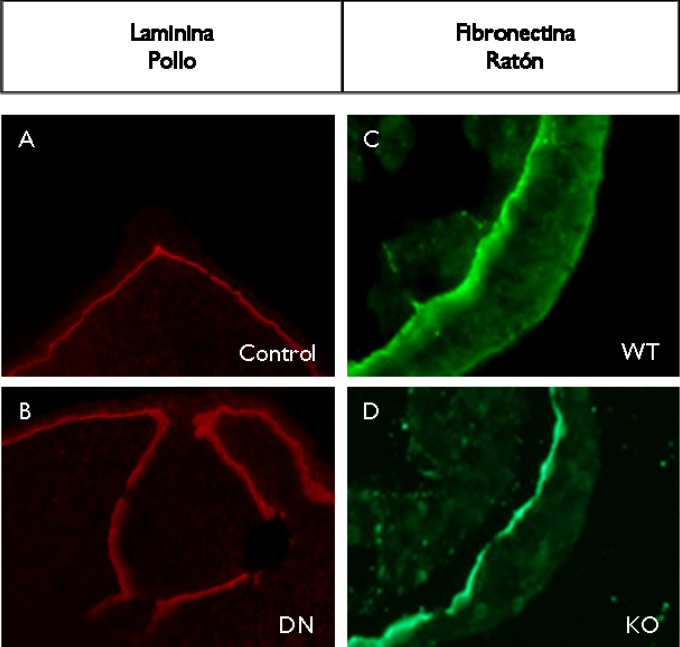
Se llevaron a cabo técnicas inmunohistoquímicas utilizando un anticuerpo anti-laminina en embriones de pollo electroporados con las construcciones *cArid3b*<sub>DN<sub>h</sub>W</sub> y *cArid3b*<sub>DN<sub>Y312A</sub></sub> y recogidos a 80 horas. Tanto en los primordios control como en los primordios manipulados el anticuerpo marcaba específicamente la membrana basal (Fig 71). Los primordios electroporados exhibieron unos niveles normales de esta proteína en la totalidad de los casos analizados (n=2). En comparación con los primordios control, y debido al AER estructuralmente defectuoso formado en los primordios electroporados, la tinción se distribuye de manera anómala, describiendo ondulaciones e introduciéndose hacia el mesénquima (Fig 71).

- Fibronectina:

La fibronectina es una glicoproteína que se deposita en la matriz extracelular en forma de fibrillas muy insolubles y que controlan las cantidades así como la disposición del colágeno en esta región. Además regula la adhesión de las células a la matriz extracelular y la membrana basal por lo que aparece activamente implicada en la migración celular y en los procesos de remodelación durante la embriogénesis.

Se llevó a cabo un estudio del patrón de la fibronectina en embriones wt así como en embriones mutantes homocigotos *Arid3b*<sup>-/-</sup>. En primordios pertenecientes a

embriones control se observó, principalmente una expresión muy intensa en la matriz extracelular asociada a la membrana basal (Fig. 71). Los embriones mutantes homocigotos *Arid3b*<sup>-/-</sup> mostraron niveles comparables pero una morfología ligeramente más irregular a los observados en los embriones controles (Fig. 71).



**Figura 71:** Estudio de la membrana basal en el primordio de embriones de pollo y ratón. A) Tinción con laminina en una sección de un primordio de embrión de pollo sin electroporar. B) La distribución del anticuerpo anti-laminina muestra las alteraciones en la membrana basal de embriones electroporados con formas dominantes negativas y recogidos a 80 horas. Aunque los niveles son normales, la disposición de esta estructura es incorrecta debido a las deficiencias en la organización del AER. C) Expresión de fibronectina en una sección de un primordio perteneciente a un embrión de ratón control. D) Inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-fibronectina demuestra que los embriones de ratón *Arid3b*<sup>-/-</sup>, aunque no de manera tan evidente como en pollo, presentan una membrana basal irregular en comparación al control.

Mediante la utilización de las técnicas anteriores se han observado alteraciones en la estructuración y morfología celular en los AERs pertenecientes a embriones mutantes *Arid3b*<sup>-/-</sup>, así como de los embriones electroporados con las formas dominantes negativas. Esta afección resulta acompañada de una alteración en el grado de madurez de dichas estructuras, al menos durante las primeras etapas. Asimismo y probablemente debido a estos defectos en la organización, se detectaron variaciones en la disposición del citoesqueleto, en la organización de uniones celulares, en la morfología de la membrana basal así como en el número de capas celulares, en un porcentaje significativo de dichos especímenes. Con respecto al número de capas observado se han evidenciado embriones con menor o mayor número de capas celulares en la cresta ectodérmica apical, siendo destacables la presencia de ejemplares con un número de capas mayor del doble de las esperadas. Por este motivo se puede afirmar que la capacidad de estratificación de estos AERs, aunque podría verse disminuida durante un periodo de tiempo circunstancial, se recupera alcanzando niveles incluso superiores al normal. No obstante la disposición de dichas capas es totalmente anómala. Por último señalamos la aparición de estructuras de aspecto tubular en embriones de pollo electroporados con las formas dominantes negativas, formaciones nunca antes detectadas en el AER. La observación de dichas organizaciones apoya la hipótesis de que *Arid3b* pueda estar controlando algún parámetro en la conformación y organización de la cresta ectodérmica apical y regulando su morfogénesis.

## **2. Desarrollo de los dedos y formación de la última falange**

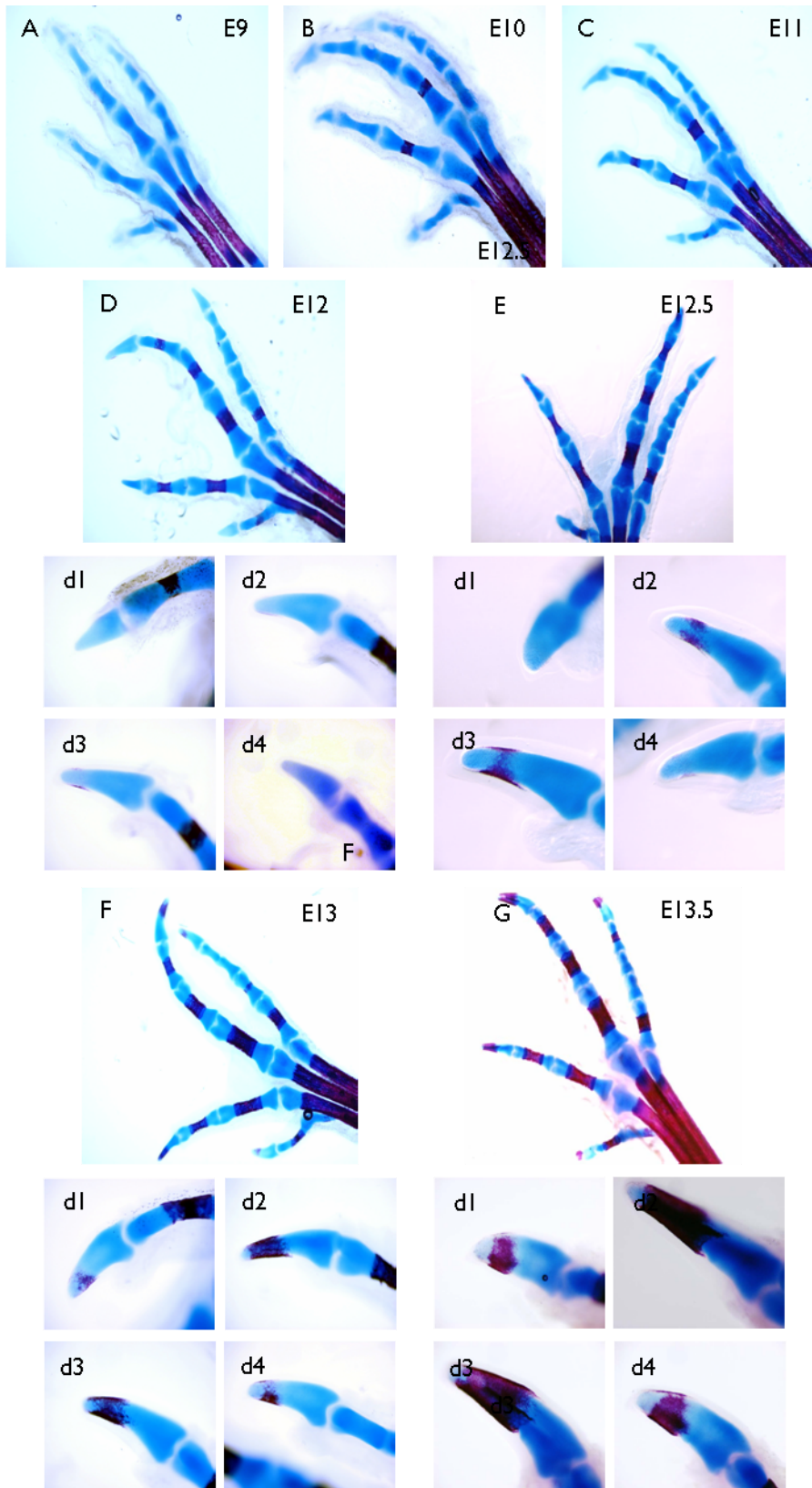
La formación de la punta supone el último paso en el establecimiento del patrón esquelético durante el desarrollo de los dedos. Tal y como ha sido explicado más en detalle en la introducción de esta tesis doctoral, existen numerosas evidencias anatómicas, histológicas y genéticas que parecen indicar que la punta es diferente al resto de las falanges. Una de las pruebas que apoyan este hecho es que, durante la osificación de los dedos en los embriones de mamíferos en general, la punta se osifica con anterioridad al resto de las falanges, aún siendo la última condensación en formarse y rompiendo de esta manera la progresión próximo-distal (Frobisch, 2008). Otro dato que confirma el carácter particular de la punta es la identificación de genes que se expresan específicamente en esta estructura durante su formación.

Partiendo de estos dos antecedentes, en esta sección se analizará la dinámica de osificación de las falanges en el embrión de pollo, así como el patrón de expresión de nuevos genes en la punta de los dedos del embrión de pollo y ratón. Para contrastar los resultados obtenidos se trasladará parte de los estudios realizados al embrión de pato.

### **2.1. Estudio del patrón de osificación de las falanges en la extremidad inferior del embrión de pollo**

En nuestro objetivo de caracterizar el proceso de formación de la punta se realizó un análisis detallado del patrón de osificación de las falanges pertenecientes a la pata del embrión de pollo. Aunque existían trabajos previos que describen la dinámica de este proceso (Harman and A., 1938; Holder, 1978), los datos proporcionados se centraban principalmente en describir el orden de osificación de las falanges. Con el propósito de confirmar estos resultados, proporcionar un grado de detalle superior y documentar visualmente este proceso, se llevaron a cabo tinciones con Alcian blue (tinción específica de cartílago) y Alizarin red (tinción específica de hueso) en patas de pollo de diferentes estadios de desarrollo.

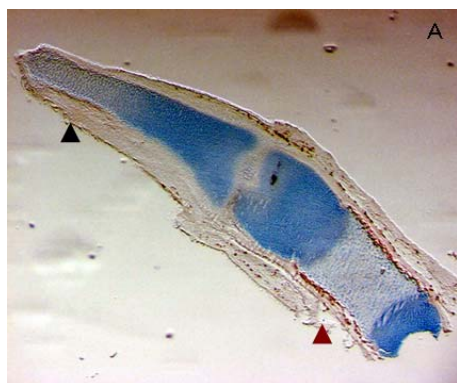
En patas de E9, aunque los metacarpos muestran tinción por Alizarin red, ninguna de las falanges presenta indicios de osificación. En tinciones realizadas en patas de E10 se percibieron las primeras muestras de osificación en las falanges proximales de los dedos 2 y 3. A estadio E11, tanto las primeras falanges de los dedos 1 y 4 como la segunda falange de los dedos 2 y 3 y la tercera falange del dedo 3 comenzaron a osificar. Las primeras puntas en osificar fueron localizadas en los dedos 2 y 3 a estadio E12 y las últimas, las pertenecientes a los dedos 1 y 4, a estadio E13. Con este análisis, resumido en la Tabla 10, se pudo concluir que el patrón de osificación de las falanges de la pata del embrión de pollo es muy diferente al observado en ratón. Mientras que en este último la osificación de la punta de cada dedo precede al del resto de las falanges, en el pollo, las falanges se osifican siguiendo la dinámica de formación de éstas. Este proceso de osificación desde las falanges más proximales a las más distales únicamente se ve alterado en el dedo 4, en el que la penúltima y última falange mostraron tinción ósea con anterioridad a las mediales (Fig. 72).



**Figura 72:** Tinciones con Alcian blue (cartilago) y Alizarin red (hueso) en extremidades inferiores de embriones de pollo a diferentes estadios, muestran el patrón de osificación de las distintas falanges. Las falanges proximales y mediales presentan un centro de osificación en la región central y dos placas de crecimiento flanqueando. Las puntas, localizadas en los paneles más pequeños, tienen un centro de osificación en la parte más distal y una placa de crecimiento inmediatamente proximal.

Tabla 10: Osificación de las falanges de la extremidad inferior del embrión de pollo						
Dedos		<u>F1</u>	<u>F2</u>	<u>F3</u>	<u>F4</u>	<u>F5</u>
	<u>D1</u>	<i>11(n=6)</i>	<i>13(n=4)</i>	x	x	x
	<u>D2</u>	<i>10(n=5)</i>	<i>11(n=6)</i>	<i>12(n=4)</i>	x	x
	<u>D3</u>	<i>10(n=5)</i>	<i>11(n=6)</i>	<i>11(n=2)</i>	<i>12(n=6)</i>	x
	<u>D4</u>	<i>11(n=6)</i>	<i>14-15(n=4)</i>	<i>15-16(n=4)</i>	<i>12-13(n=4)</i>	<i>13(n=3)</i>
Número en cursiva indica los días de incubación y entre paréntesis el número de extremidades analizadas						

Posteriormente se analizaron pormenorizadamente las falanges mediales osificadas a día 12-12.5 de incubación, se incluyeron en parafina y se cortaron. Estas muestras presentaban un centro de osificación en la región medial de la falange y, flanqueando, dos placas de crecimiento a cada lado. Además a estadios anteriores, el recién iniciado proceso de osificación en las falanges proximales/mediales revela una conformación anular (Fig. 72). A continuación se comparó en detalle la estructura anatómica e histológica de estas falanges con puntas procedentes de patas de estadio E12. Las puntas estudiadas exhibieron un centro de osificación situado en su parte más distal y una única placa de crecimiento adyacente. Además, al comienzo del proceso de osificación se detectaron mayores niveles de tinción ósea en la región ventral de la punta y posteriormente en la dorsal (Fig. 72). Esta tinción, paulatinamente, desde estas posiciones invade toda la falange.



**Figura 73:** Secciones de las dos últimas falanges pertenecientes al dedo 3 de un embrión de pollo de 12 días de desarrollo teñido con Alcian blue (cartílago) y Alizarin red (hueso). La punta de flecha negra señala el centro de osificación en la última falange, localizado en posición distal. La punta de flecha marrón señala el centro de osificación de la penúltima falange situado en una región central.

## 2.2. Estudio del patrón de osificación de las falanges en la extremidad superior del embrión de pollo

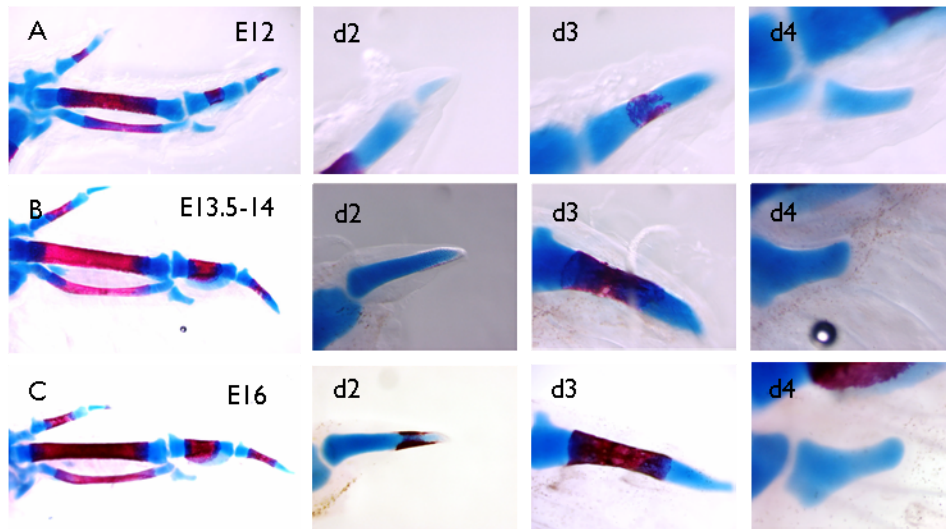
Una vez realizado un análisis exhaustivo del patrón de osificación de las falanges de la pata en el embrión de pollo, se llevó a cabo el mismo tipo de estudio en el ala. Se efectuaron tinciones específicas para cartílago y hueso en alas de pollo de diferentes etapas embrionarias (de E10 a E17) y el resultado obtenido se resumió en la siguiente tabla (Tabla 11).

<b>Tabla 11: Osificación de las falanges de la extremidad superior de pollo</b>			
<b>Dedos</b>		<b><u>F1</u></b>	<b><u>F2</u></b>
	<b><u>D2</u></b>	<i>11(n=6)</i>	<i>14-15(n=9)</i>
	<b><u>D3</u></b>	<i>11(n=6)</i>	<i>12(n=7)</i>
	<b><u>D4</u></b>	-	x
Número en cursiva indica los días de incubación y entre paréntesis el número de extremidades analizadas			

Como se puede observar, las falanges proximales de los dedos 2 y 3 se osificaron a estadio E11 mientras que en las puntas resultó imposible detectar tinción ósea hasta día 12, en la última falange del dedo 3. La punta del dígito 2 comenzó a revelar las primeras muestras de osificación a estadio E14-15. La única falange del dedo 4 no mostró signos de osificación a ninguno de los estadios analizados (Fig. 74).

Cabe destacar que las falanges proximales y la última falange del dedo 3 presentaron una dinámica de osificación similar a la detectada en falanges mediales y proximales de la pata, mostrando un centro de osificación con forma de anillo en la región central, y dos placas de crecimiento a cada lado (Fig. 74). Sin embargo, la última falange del dedo 2 reveló un patrón de osificación análogo al observado en las puntas pertenecientes a la pata, con un centro de osificación en el ápice, inicialmente en posición ventral y una placa de crecimiento subyacente (Fig. 74).

De este ensayo se pudo concluir que en la extremidad superior del embrión de pollo, únicamente la última falange del dedo 2 osifica igual que una punta mientras que la última falange del dedo 3 lo hace de forma idéntica a la que lo hacen las falanges proximales/mediales.



**Figura 74:** Tinciones con Alcian blue (cartílago) y Alizarin red (hueso) en extremidades superiores de embriones de pollo a diferentes estadios, muestran el patrón de osificación de las distintas falanges. La última falange del dedo 2 osifica de la misma manera que las puntas de las patas. La última falange del dedo 3 osifica de manera similar a las falanges proximales y mediales.

Tras el estudio de osificación realizado en las extremidades de pollo, el resultado obtenido demostró, de forma concluyente, que el patrón de osificación de las falanges en la extremidad superior e inferior del embrión de pollo sigue una dinámica diferente a la descrita en embrión de ratón. Además se evidenciaron diferencias significativas en el proceso de osificación entre falanges proximales/mediales con respecto a la punta.

### **2.3. Caracterización del patrón de expresión de Sp8 en las extremidades del embrión de pollo y ratón**

Sp8 es uno de los homólogos del gen de *Drosophila melanogaster* *Buttonhead*. A ambos genes, que codifican para factores de transcripción de la familia de los dedos de zinc, se les ha involucrado en numerosos procesos durante el desarrollo embrionario tanto de vertebrados como de invertebrados (Bell et al., 2003; Kawakami et al., 2004; Treichel et al., 2003; Wimmer et al., 1993). Sp8 se expresa, entre otras estructuras, en la cresta ectodérmica apical durante el desarrollo del primordio de la extremidad de pollo y ratón. Ensayos de ganancia de función en el embrión de pollo (Kawakami et al., 2004) y de pérdida de función en el embrión de pollo y ratón (Bell et al., 2003; Kawakami et al., 2004; Treichel et al., 2003) han demostrado la relevancia de este gen en la inducción y el mantenimiento del AER. Aunque tanto la expresión de este gen como su papel en etapas tempranas en el desarrollo del primordio han sido caracterizadas en detalle, no existe ninguna referencia en cuanto al patrón de expresión o al posible rol de Sp8 en etapas más tardías.



- Caracterización del patrón de expresión de *Sp8* en las extremidades del embrión de pollo (Fig 75).

Con el fin de determinar el patrón de expresión de *Sp8* en el embrión de pollo antes de la formación de los dedos, se realizó una hibridación *in situ* en especímenes de estadio 22HH. En estas muestras se observó que *Sp8* se expresaba en estructuras tales como ciertas regiones del encéfalo, el tubo neural, placoda olfatoria, vesícula ótica y cresta ectodérmica apical como se había descrito con anterioridad (Kawakami et al., 2004). En ensayos efectuados en patas a estadios más tardíos se comprobó que esta expresión en el AER, comienza a debilitarse durante el proceso de desaparición de esta estructura a estadios 32-33HH. Posteriormente en patas de estadio 33HH el patrón de expresión de *Sp8* en la cresta ectodérmica apical resulta indetectable. Curiosamente y de forma similar a la observada en el embrión de ratón, *Sp8* se reactiva en la última falange durante su formación, a partir de estadio 34-35HH. Mediante el estudio de secciones histológicas procedentes de embriones de estadio 35-36HH se observó que la expresión de *Sp8* en la punta de los dedos se restringe al ectodermo.

A continuación se analizó el patrón de expresión de este gen en alas de pollo de estadio 34-35HH. Sorprendentemente, la hibridación *in situ* con la sonda de *Sp8* en estas muestras reveló una fuerte expresión de este gen únicamente en la última falange del dedo 2.

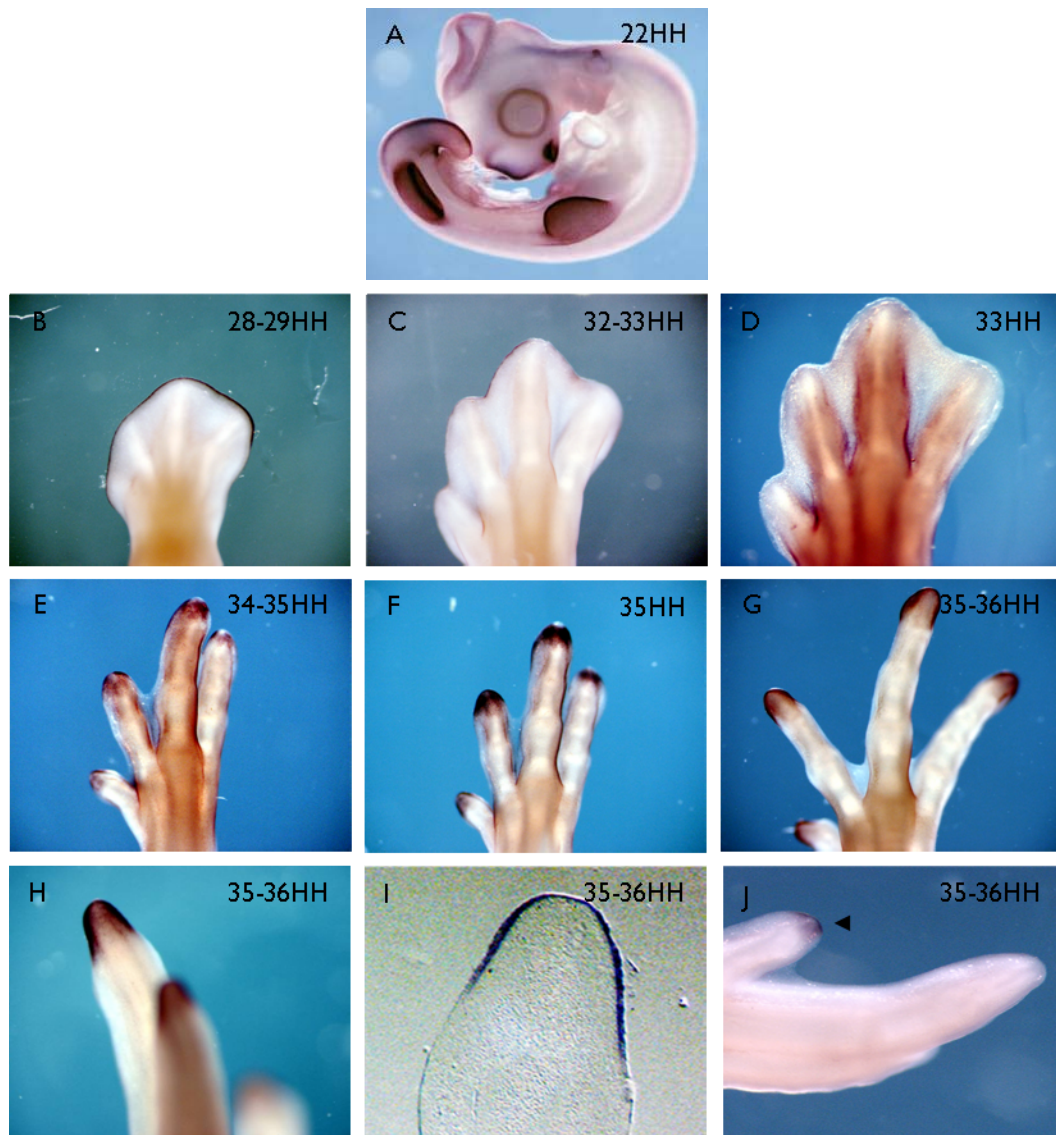
- Caracterización del patrón de expresión de *Sp8* en las extremidades del embrión de ratón (Fig. 76).

Para confirmar el patrón de expresión previamente publicado (Bell et al., 2003; Treichel et al., 2003) se realizaron hibridaciones *in situ* en embriones de ratón de estadio E10.5 de desarrollo. Tal y como estaba descrito, se pudo observar expresión de *Sp8* en diferentes regiones del encéfalo, tubo neural, placodas olfatorias, vesículas óticas, punta de la cola y AER.

En patas de embrión de ratón de diferentes estadios se llevaron a cabo hibridaciones *in situ* en especímenes enteros con la sonda de *Sp8*. Estos ensayos revelaron que la expresión de *Sp8* en el AER se va atenuando (E12.5) hasta que sus niveles se hacen indetectables (E13.5). Esta progresiva desaparición de la expresión de *Sp8* en la cresta ectodérmica apical coincide con la eliminación gradual del propio AER. Sorprendentemente, en patas de estadios más avanzados (E14.5-15.5), durante la formación de la última falange, se observó una intensa reactivación de la expresión de en la punta. Mediante hibridación *in situ* se detectaron niveles superiores de *Sp8* en la región dorsal de esta estructura. Posteriormente, se realizaron cortes histológicos de muestras de estadio E15.5 que evidenciaron que esta fuerte expresión de *Sp8* en la punta aparece restringida al ectodermo.

Este estudio nos permitió caracterizar en detalle el patrón de *Sp8* en el embrión de pollo y de ratón a estadios tardíos del desarrollo de la extremidad. Se pudo determinar cómo este gen, una vez apagado en el AER, se reactiva fuertemente en el ectodermo de la última falange. En la extremidad superior del embrión de pollo se mostró cómo esta reactivación se produce únicamente en la punta del dedo 2.





**Figura 75:** Patrón de expresión de *Sp8* en el embrión de pollo mediante hibridación *in situ*. A) En estadios tempranos, *Sp8* se expresa en el AER durante el desarrollo del primordio tal y como se demostró por hibridación *in situ*. B, C y D) En etapas posteriores, *Sp8* desaparece del AER durante la regresión de esta estructura. E, F y G) Más tarde *Sp8* reaparece en la última falange durante su formación. H) Hibridación *in situ* con la sonda de *Sp8* en dedos de una pata de estadio 35-36HH. Esta expresión no muestra restricciones dorso-ventrales. I) Secciones de parafina de estos dígitos evidenciaron una localización ectodérmica de *Sp8* en la punta de los dedos. J) Hibridación *in situ* en alas de estadio 35-36HH que muestran la expresión de *Sp8* en el dedo 2 del ala.



**Figura 76:** Hibridaciones *in situ* en embriones de ratón a diferentes estadios muestran el patrón de expresión de *Sp8* en esta especie. A) *Sp8* se expresa, entre otras estructuras, en el AER durante el desarrollo de la extremidad. B, C y D) La expresión de *Sp8* se deja de detectar en el AER coincidiendo con la desaparición de esta estructura. E, F y G) Más adelante, *Sp8* reaparece en la punta de los dedos durante su formación, (H) especialmente en la región dorsal. (I) Secciones de dígitos de embriones de ratón de E15 muestran que esta expresión se ha localizado específicamente en el ectodermo.

## **2.4. Caracterización del patrón de expresión de Bambi en las extremidades del embrión de pollo**

*Bambi* es un gen que codifica para una proteína transmembrana que actúa como regulador negativo de la vía de BMPs (Onichtchouk et al., 1999). Esta proteína, relacionada con la familia tipo I de los receptores TGF $\beta$ , es capaz de unirse a las BMPs pero carece de dominio kinasa intracelular. Este hecho provoca que BAMBI actúe como un receptor dominante negativo, secuestrando moléculas de BMP sin desencadenar respuesta alguna y privando a los receptores de esta vía de su ligando. Estudios anteriores han demostrado la presencia de *Bambi* en diferentes etapas del desarrollo embrionario (Grotewold et al., 2001; Onichtchouk et al., 1999; Tsang et al., 2000) o durante el proceso de regeneración de la aleta caudal en pez cebra adulto. En la extremidad de ratón, *Bambi* se expresa en el mesénquima y el AER durante el crecimiento del primordio para, posteriormente, restringirse a los interdógitos. A etapas más tardías *Bambi* se expresa en la punta de los dedos. Por su parte, en el embrión de pollo se ha descrito la presencia de *Bambi* en los interdógitos (Zuzarte-Luis et al., 2004). Pese al sugerente patrón de expresión de esta molécula en la extremidad de pollo y ratón, recientes ensayos de pérdida de función en este último modelo, no han revelado ningún fenotipo evidente en el desarrollo de la extremidad (Chen et al., 2007).

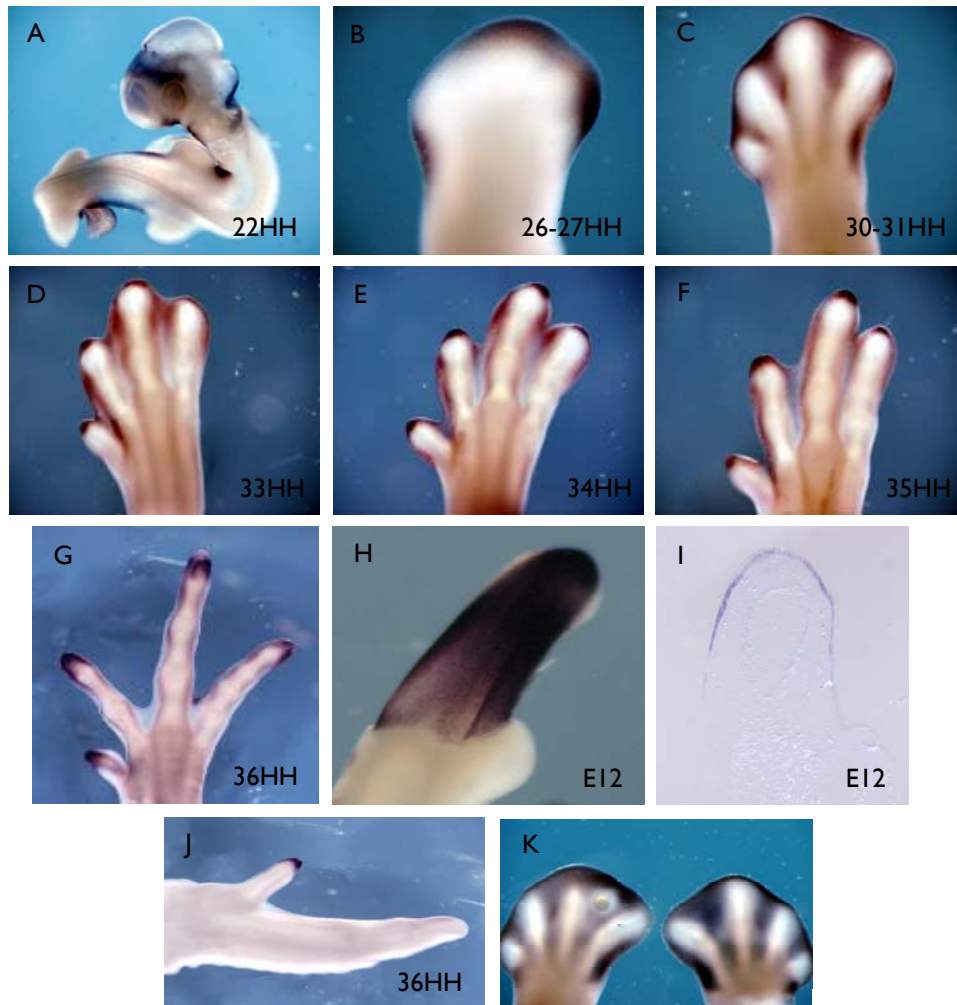
Se llevaron a cabo hibridaciones *in situ* en embriones de pollo de estadio 22HH y se determinó que *Bambi* se expresaba en una franja muy pronunciada en el encéfalo anterior, proceso nasal, arcos branquiales, vesícula ótica y flanco del embrión. A diferencia del embrión de ratón, no fuimos capaces de detectar *Bambi* en el AER a estadios comparables (Fig. 77). A continuación, se analizó la expresión de este gen en etapas posteriores durante la formación de la extremidad. En patas de estadio 26-27HH, *Bambi* aparece restringido al mesénquima distal de la extremidad, para posteriormente detectarse en los interdógitos. Se efectuaron hibridaciones *in situ* en patas de etapas de desarrollo más avanzadas y se pudo evidenciar, a estadio 33-35HH una aparición de *Bambi* en el mesénquima distal de la punta. Esta expresión detectada, nunca descrita con anterioridad, resultó ser dinámica, comenzando en dígitos anteriores y alcanzando de manera secuencial los más posteriores. Esta progresión en la expresión de *Bambi* correlaciona con la formación de la punta en cada uno de los dedos (Fig. 77). Se analizó el patrón de expresión de *Bambi* en la punta de los dedos de la pata a estadios posteriores (36HH) y se pudo determinar que *Bambi* aumenta sus niveles en la última falange a esos estadios. Secciones de estas muestras revelaron que la expresión de *Bambi* se delimita al ectodermo de la punta.

Para determinar el patrón de expresión *Bambi* en la última falange durante las etapas más tardías en el desarrollo de la extremidad superior, se realizaron hibridaciones *in situ* en alas de estadio 36HH y posteriores. En este ensayo se mostró que, curiosamente, sólo la punta del dedo 2 expresaba niveles detectables de *Bambi* (Fig. 77).

De los ensayos realizados podemos deducir que, al igual que en el embrión de ratón, *Bambi* se expresa a altos niveles en la punta de los dígitos en el embrión de pollo. Este marcador de puntas únicamente se expresa en la última falange del dedo 2 en el ala.

Por último, se estudió la regulación por parte de la vía de BMPs de este pseudoreceptor en el tejido interdigital. Con este fin, se colocaron microesferas

impregnadas en NOGGINA en los interdígitos de embriones de pollo de estadio 26-27HH. Los ejemplares supervivientes se recogieron 24 horas después de la implantación de la microesfera. En dichos especímenes (n=3) se realizaron hibridaciones *in situ* con la sonda de *Bambi* y se pudo determinar un descenso en los niveles de esta molécula en un 100% de los casos (Fig. 77). Estos ensayos correlacionan con trabajos anteriores en los que se muestra una activación de *Bambi* en el interdígito del embrión de pollo tras la colocación de microesferas impregnadas en BMPs (Zuzarte-Luis et al., 2004) Ambos resultados confirman una regulación de *Bambi* mediada por la vía de BMPs en esta estructura.



**Figura 77:** Patrón de expresión de *Bambi* en el embrión de pollo. A) Hibridaciones *in situ* con la sonda de *Bambi* revelaron expresión de este gen en diferentes estructuras durante el desarrollo embrionario. B y C) A estadio 26-27HH se detecta en el mesénquima de la extremidad y más adelante en los interdígitos. D-F) A estadio 34-35HH *Bambi* se expresa intensamente en el mesénquima distal de la punta de los dedos, siguiendo un patrón antero-posterior y correlacionando con el establecimiento de la última falange. G, H e I) Más tarde *Bambi* se expresa en el ectodermo de la punta de los dedos. J) esta expresión sólo se detecta en la punta del dedo 2 en la extremidad superior del embrión de pollo. K) La aplicación de microesferas impregnadas en NOGGINA regula negativamente la expresión de *Bambi* en los interdígitos.

## 2.5. Estudio del patrón de osificación de las falanges en la extremidad inferior del embrión de pato

En los experimentos anteriores se analizó el patrón de osificación, así como la dinámica de expresión de *Bambi* y *Sp8* en el ala del embrión de pollo. Los resultados obtenidos demostraron que la última falange del dedo 3 no compartía las características observadas en el resto de puntas. Esto se correlaciona con que, en el ala del pollo adulto, el dedo 2 presenta uña o garra frente al dedo 3, que carece de ella. En publicaciones anteriores se ha descrito que algunas especies de aves presentan, en el dedo 3, una falange extra así como una uña o garra (Fisher, 1940). Todas estas evidencias parecen indicar que el dedo 3 del ala del pollo, en realidad corresponde a un dígito truncado que carece de última falange o punta.

El orden Anseriformes, y en particular la familia Anatidae, engloba un amplio número de especies que exhiben garras o uñas vestigiales en el dedo 3 del ala (Fisher, 1940). Para realizar un estudio comparativo entre miembros de este género y el embrión de pollo, se adquirieron huevos de pato fecundados y se llevaron a cabo tanto tinciones esqueléticas como estudio del patrón de expresión de *Bambi* en las extremidades de embriones de esta especie. Los resultados de las tinciones con Alcian blue y Alizarin red en extremidades inferiores del embrión de pato se resumen en la siguiente tabla (Tabla II)

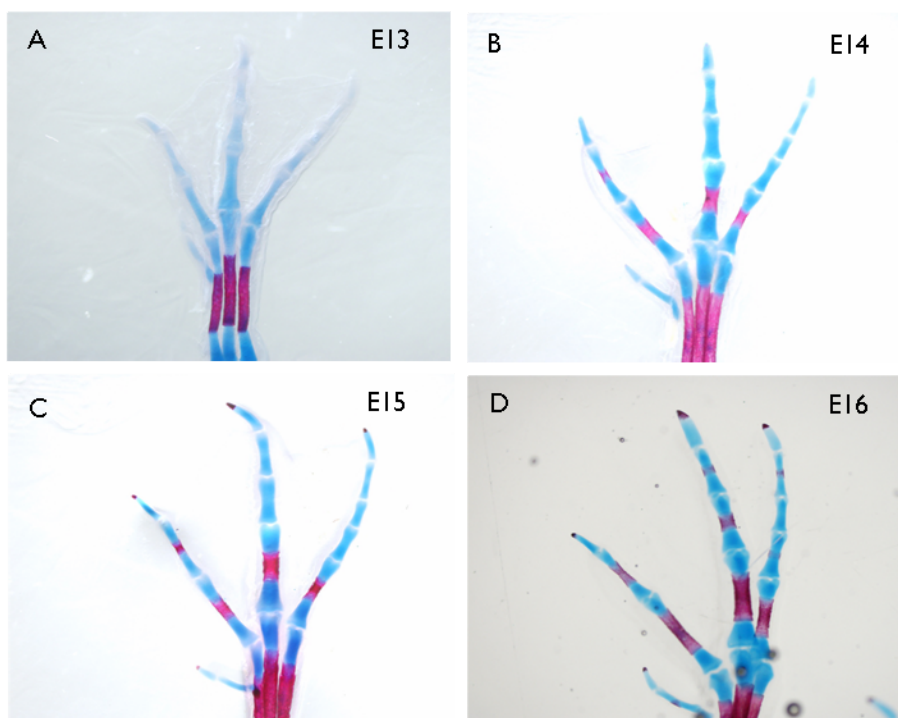
Tabla II: Osificación de las falanges de la extremidad inferior del embrión de pato						
Dedos		<u>F1</u>	<u>F2</u>	<u>F3</u>	<u>F4</u>	<u>F5</u>
	<u>D1</u>	<i>15-16(n=3)</i>	<i>14(n=3)</i>	x	x	x
	<u>D2</u>	<i>14(n=5)</i>	<i>14(n=3)</i>	<i>14-15(n=3)</i>	x	x
	<u>D3</u>	<i>14(n=5)</i>	<i>15-16(n=4)</i>	<i>15-16(n=5)</i>	<i>14-15(n=3)</i>	x
	<u>D4</u>	<i>14(n=5)</i>	<i>15-16(n=3)</i>	<i>17(n=4)</i>	<i>15-16(n=2)</i>	<i>14-15(n=3)</i>
Número en cursiva indica los días de incubación y entre paréntesis el número de extremidades analizadas						

En este ensayo se pudo determinar que las falanges proximales y mediales del dedo 2 de la extremidad inferior del pato, osificaban con anterioridad a la punta. Este patrón de osificación recuerda al obtenido en la mayoría de los dígitos en la pata del embrión de pollo. Sin embargo cuando se analizaron el resto de los dedos, se detectó un patrón de osificación relativamente similar al que se conoce en el embrión de ratón. En las puntas de estos dedos la aparición de tinción ósea precede a la de las falanges mediales (Fig. 78).

Cuando se analizó el patrón de osificación a nivel histológico de las falanges proximales y mediales de estos especímenes, se determinó que osificaban de manera idéntica a la observada en sus equivalentes en pollo, es decir, con un centro de osificación en la región central, flanqueado por dos placas de crecimiento y con forma de anillo. Por



otro lado, las puntas de los dedos de la pata del embrión de pato, mostraban un centro de osificación en la región distal y una única placa de crecimiento adyacente (Fig. 78). Además, en las primeras etapas de la osificación, la tinción con Alizarin red mostraba una mayor intensidad en la región ventral del centro de osificación, tal y como sucedía en el pollo.



**Figura 78:** Patrón de osificación en la extremidad inferior del embrión de pato mediante tinciones con Alcian blue (cartílago) y Alizarin red (hueso) a diferentes estadios.

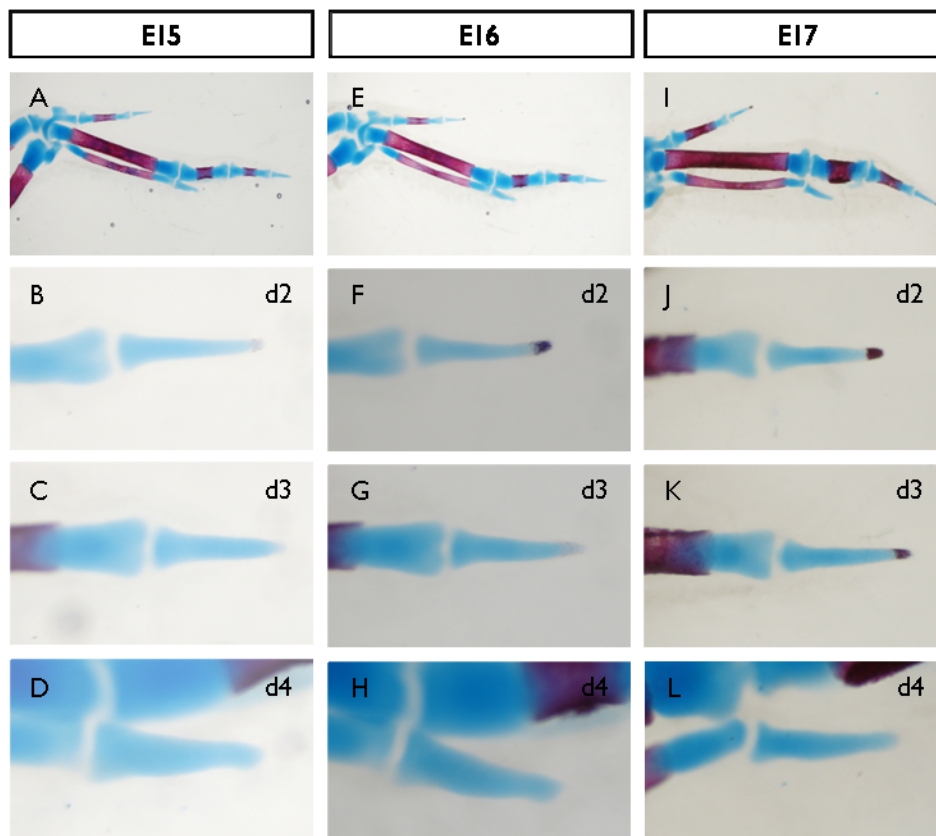
## **2.6. Estudio del patrón de osificación de las falanges en la extremidad superior del embrión de pato**

En nuestro estudio comparativo del patrón de osificación entre las extremidades del embrión de pollo y de pato, se realizaron tinciones de cartílago y hueso en el ala de embriones de pato a diferentes tiempos de incubación. La primera evidencia que se obtuvo es que el dedo 3 de ala del embrión de pato presentaba, como había sido descrito, una falange extra en comparación con el embrión de pollo. Los resultados de la dinámica de osificación se resumen en la Tabla 12.

Si obviamos la presencia de una tercera falange en el dedo 3, el patrón de osificación en la extremidad superior del embrión de pato resulta, en cierto modo, comparable al observado en pollo (Fig. 79).

Tabla 12: Osificación de las falanges de la extremidad superior del embrión de pato				
Dedos		<b>F1</b>	<b>F2</b>	<b>F3</b>
	<b>D2</b>	<i>14</i> (n=5)	<i>15</i> (n=4)	x
	<b>D3</b>	<i>14-15</i> (n=6)	<i>15</i> (n=4)	<i>16-17</i> (n=2)
	<b>D4</b>	-	x	x
Número en cursiva indica los días de incubación y entre paréntesis el número de extremidades analizadas				

Se analizó, de forma más precisa, la distribución de la tinción ósea en las falanges de las alas estudiadas y se pudo determinar que las falanges mediales y proximales en el ala del embrión de pato presentaban un centro de osificación en la región central de la falange así como dos placas de crecimiento flanqueando (Fig. 79). En esta especie, tanto en la última falange del dedo 2 como la del dedo 3, se pudo observar un centro de osificación en la región más distal y una placa de crecimiento colocada de forma adyacente (Fig. 79). Este patrón de osificación correspondería al descrito anteriormente en todas las puntas de la pata del pollo así como en la última falange del dedo 2 del ala.



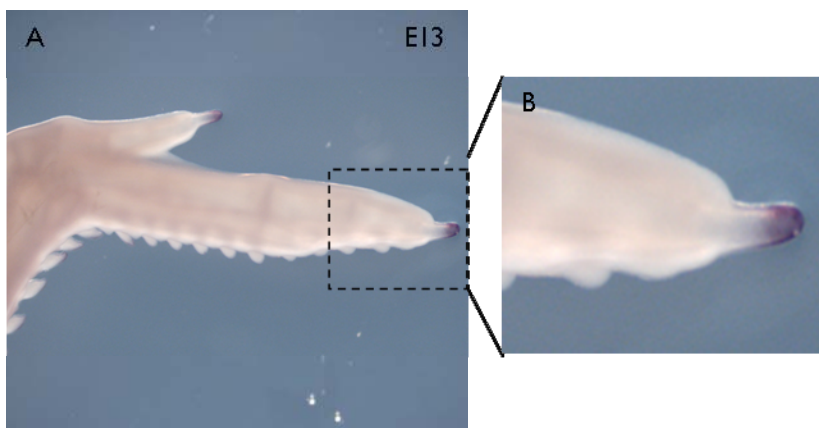
**Figura 79:** Patrón de osificación de la última falange en la extremidad superior del embrión de pato mediante tinciones con Alcian blue (cartílago) y Alizarin red (hueso) a diferentes estadios. A-D) A E15 la punta del dedo 2 empieza a mostrar signos de osificación. E-H) A E16 la punta del dedo 2 muestra tinción esquelética evidente mientras que la punta del dedo 3 empieza a osificarse. I-L) A E17 se puede observar como las puntas del dedo 2 y 3 presentan un centro de osificación en la región distal y una placa de crecimiento adyacente en posición proximal.

## **2.7. Caracterización del patrón de expresión de Bambi en las extremidades del embrión de pato**

El objetivo del siguiente experimento consistió en determinar si el dedo 3 del ala del embrión de pato, que reunía las características necesarias para ser considerado una verdadera punta, expresaba marcadores de última falange como *Bambi* o *Sp8*. Se realizaron hibridaciones *in situ* en patas y alas de pato con las sondas de *Bambi* y *Sp8* de pollo. Únicamente la sonda de *Bambi* mostró un patrón específico en las extremidades utilizadas. Al igual que en el embrión de pollo, *Bambi* fue detectado aparentemente en el ectodermo de la última falange de todos y cada uno de los dígitos de la extremidad inferior. En el caso de la extremidad superior, la expresión de *Bambi* se observó de manera evidente tanto en la punta del dedo 2 como en la del dedo 3 (Fig. 80). Este patrón de expresión contrastaba totalmente con el observado en la extremidad superior del embrión de pollo.

Si recopilamos los datos mostrados, éstos indican que la extremidad superior del pato posee, en efecto, una falange extra en el dedo 3 en comparación con el pollo. Además esta falange, se osifica de igual manera que una punta, exhibe marcadores asociados a la última falange y presenta un apéndice ectodérmico asociado propio de la punta, como es la uña.

La presencia de dos únicas falanges, el tipo de osificación mostrado, la ausencia de marcadores de puntas, así como la carencia de uña, revelan que la última falange del dedo 3 en el ala del pollo no reúne las características necesarias para ser considerada una punta. Por tanto, estas evidencias sugerirían que el dígito 3 en la extremidad superior del pollo carece de punta y podría ser considerado un dedo truncado o incompleto.



**Figura 80:** Hibridación *in situ* con la sonda de *Bambi* de pollo en la extremidad superior de un embrión de pato de estadio E13. A diferencia del pollo, *Bambi* se expresa en la punta del dedo 3 además de en la última falange del dedo 2.



## 2.8. Caracterización del patrón de expresión de *Bambi* en extremidades superiores de pollo en las que se inducen transformaciones en la identidad de los dedos

Experimentos anteriores (Dahn and Fallon, 2000) demostraron que el mesodermo de los interdígitos almacenaba la información que especificaba la identidad de los dedos en etapas tardías. Asimismo, mediante modificaciones en estos interdígitos, se determinó que existía una corta ventana temporal en la cual la identidad de los dígitos podía ser alterada (por ejemplo transformar un primordio de dedo 3 en dedo 2)

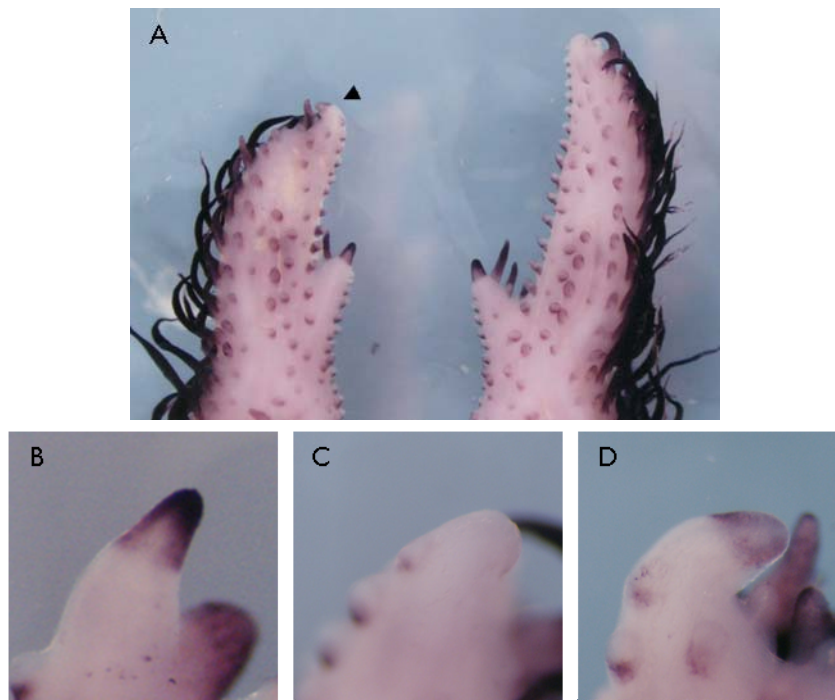
Utilizando la expresión de *Bambi* como criterio molecular diferencial, capaz de distinguir lo que es una punta del resto de falanges, se llevaron a cabo experimentos de manipulación en los interdígitos en el ala del pollo, similares a los realizados por el grupo de Fallon en el año 2000.

Se realizaron dos tipos de experimentos. En el primero (tipo 1) se eliminó la mitad posterior del dedo 3 junto con su interdígito posterior (ID3) en extremidades superiores de pollo de estadio 28-29HH. En el segundo (tipo 2), se realizó una bisección en el dedo 3 del ala de embriones estadio 27-29HH. Los embriones supervivientes se recogieron 7 días después de la manipulación (cumpliendo un total de 12-13 días de incubación) y sobre ellos se llevó a cabo una hibridación *in situ* con la sonda de *Bambi*. Los resultados obtenidos vienen resumidos en la siguiente tabla (Tabla 13).

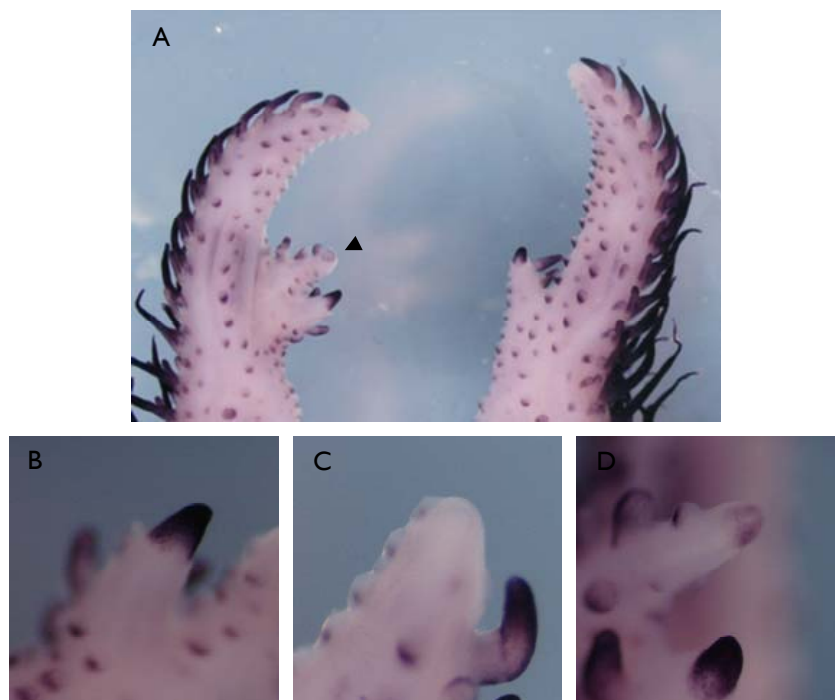
Tabla 13: Manipulaciones para inducir cambios de identidad en el dedo 3 del ala					
	Operados	Recogidos	Sin fenotipo o sin dedo 2 evidente	Dedo 3 más corto	Dedo 3 con expresión de <i>Bambi</i>
Experimentos Tipo 1	35	34	14	20	3
Experimentos Tipo 2	11	9	7	2	2
<b>Total</b>	46	43	21	22	5

Un 48% de los embriones recogidos (n=43) no mostraron fenotipo alguno o no mostraban un dedo 2 claramente identificable mientras que 52% mostraron un dedo 3 más corto, similar al descrito por Dahn en el 2000. Estos dígitos más cortos no parecían tener punta anatómicamente distinguible (Figs. 81 y 82). De estos embriones con fenotipo (n=22), un 23% presentaron expresión evidente de *Bambi* en la última falange del dedo 3 transformado (Figs. 81 y 82). Si bien la expresión de este gen no era tan intensa como la observada en el dedo 2, estos resultados evidenciaron que, con cierta frecuencia, el dedo 3 de las extremidades manipuladas adquiría, al menos parcialmente, una característica molecular propia del dedo 2 en el ala del pollo. Este

dato, junto con las evidencias morfológicas detectadas en estos dedos, parece sugerir un cambio de identidad en el dígito 3 hacia un dedo más anterior.

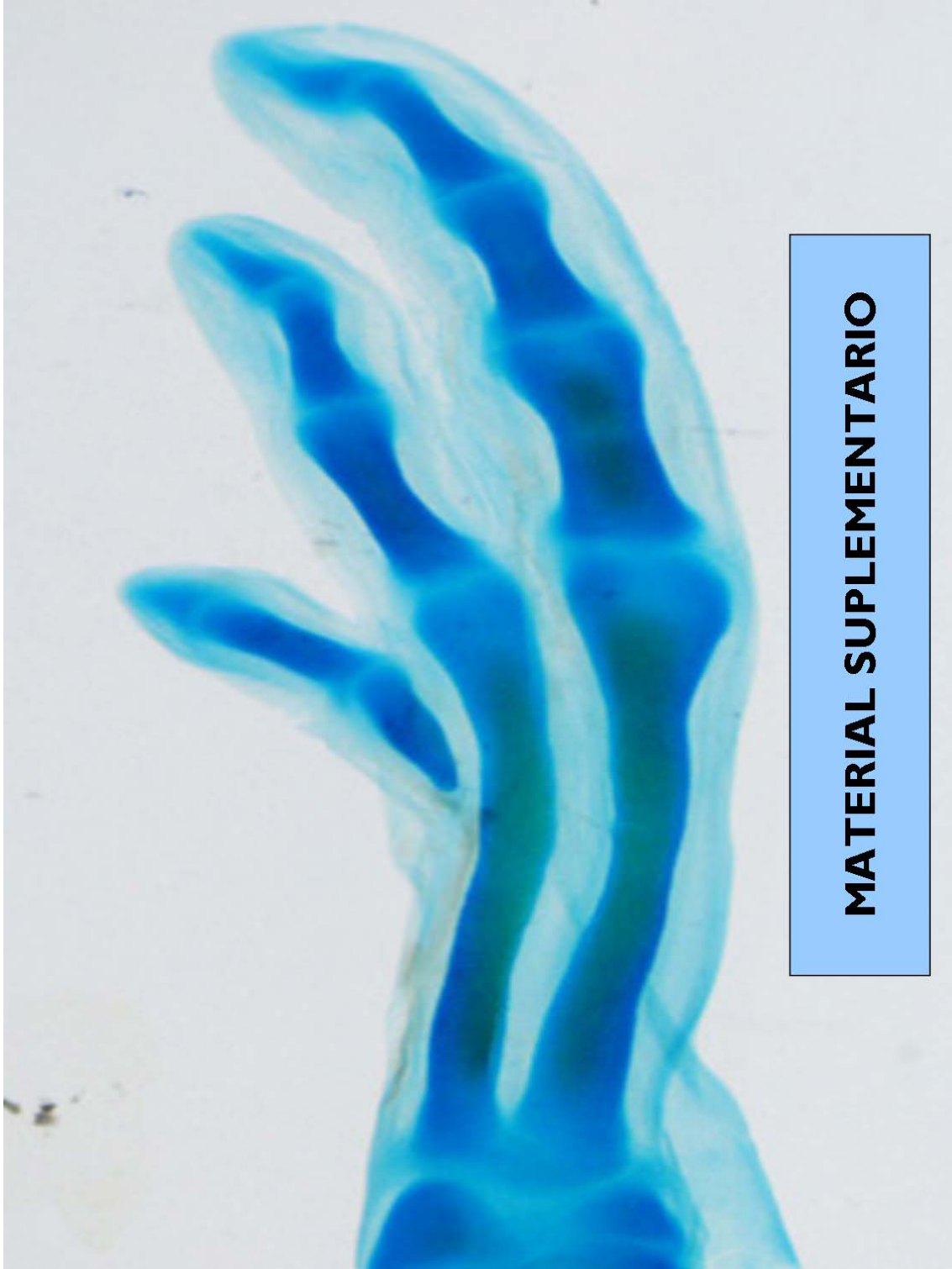


**Figura 81:** Hibridación *in situ* con la sonda de *Bambi* en alas de pollo de E12-13 a las que se ha eliminado quirúrgicamente el interdígito 3 y la parte posterior del dedo 3 a estadio 28-29HH. A) La fracción restante anterior del dedo adquiere tamaño inferior, similar al dedo 2. B) Expresión de *Bambi* en la punta del dedo 2. C) No es posible detectar expresión de *Bambi* en la última falange del dedo 3. D) *Bambi* se expresa, de manera evidente, en la última falange del dedo generado a partir de la fracción anterior del dedo 3 sugiriendo una transformación de tipo  $D3^* = D2$ .



**Figura 82:** Hibridación *in situ* con la sonda de *Bambi* en alas de pollo de E12-13 a las que se ha biseccionado el dedo 3 a estadio 27HH. A) La fracción anterior del dedo biseccionado adquiere una morfología similar a la observada en el dedo 2 mientras que la mitad posterior permanece inalterada. B) Expresión de *Bambi* en la última falange del dedo 2. C) La punta del dedo 3 del ala control no muestra expresión de *Bambi* en la punta. D) *Bambi* se expresa, de manera evidente, en la última falange del dedo generado a partir de la fracción anterior del dedo 3, sugiriendo una transformación de tipo  $D3^{ant*} = D2$ .





## **MATERIAL SUPLEMENTARIO**



# **MATERIAL SUPLEMENTARIO**

Figura suplementaria I: Tomografía de proyección óptica en embriones de ratón *Arid3b*<sup>+/-</sup> de estadio E9.5 que muestra la expresión de *Arid3b* mediante tinción lac-Z.

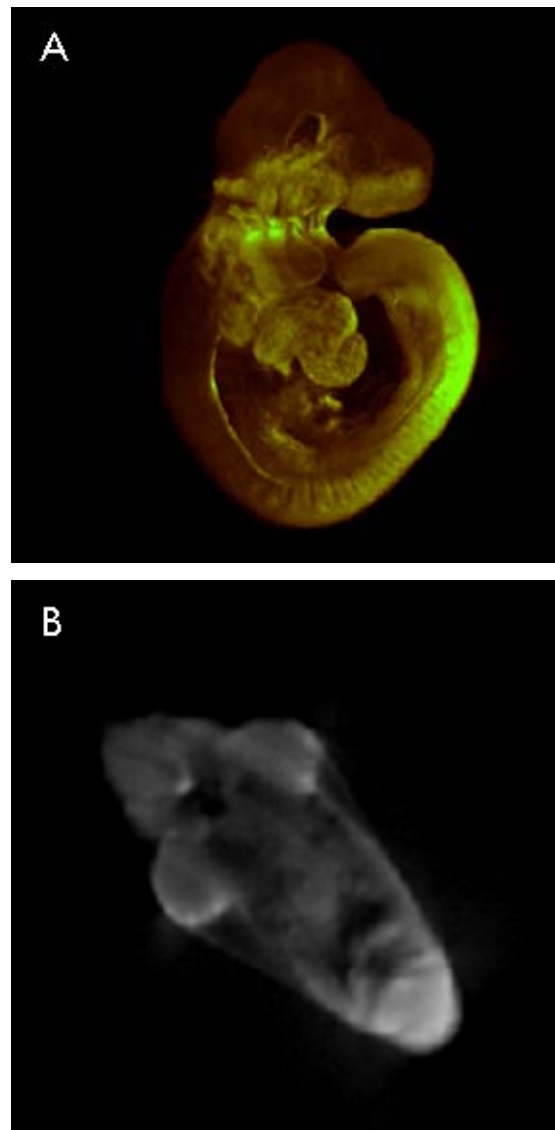
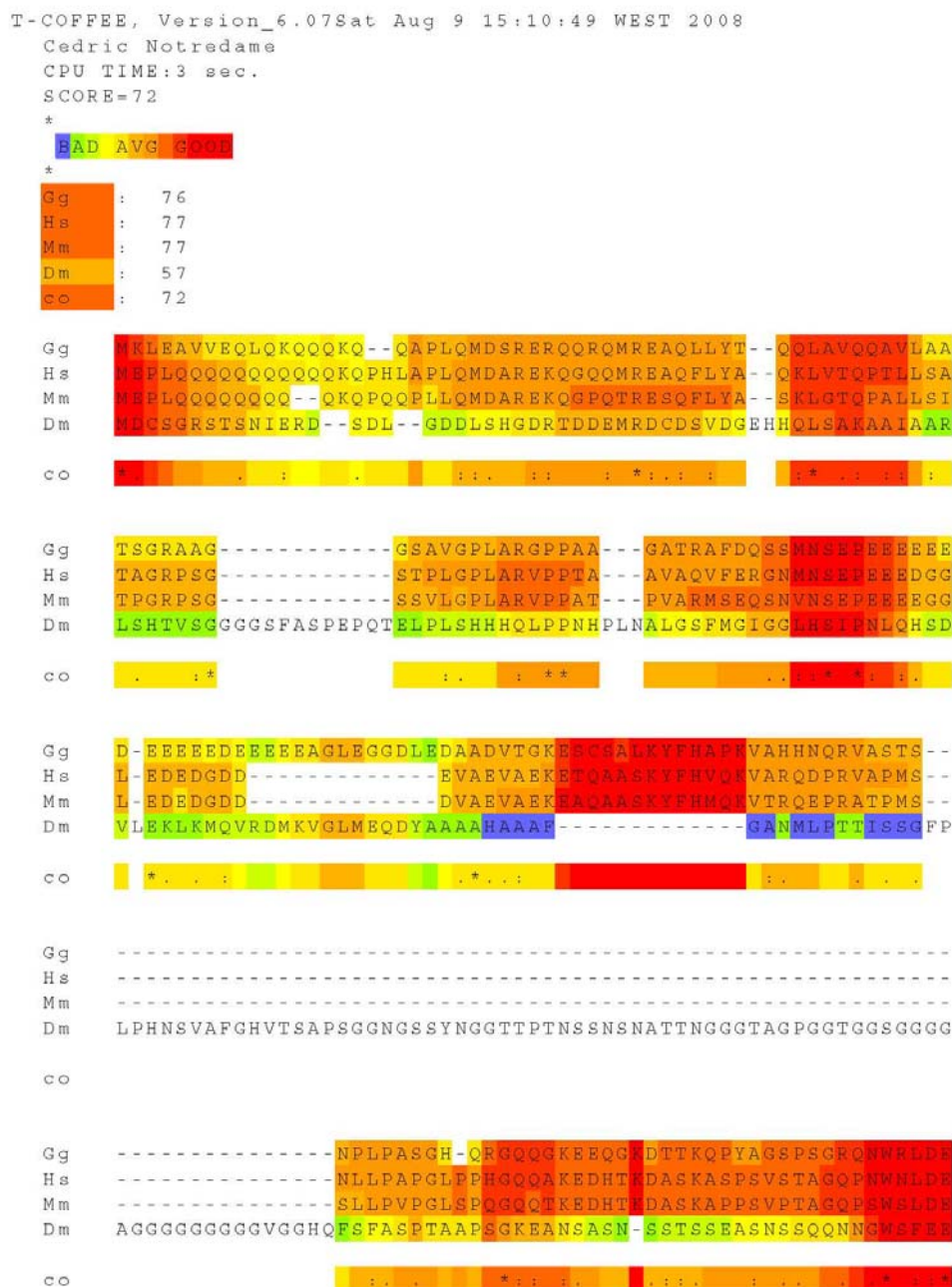


Figura suplementaria 2: Alineamiento de la secuencia aminoacídica predicha para Arid3b de pollo con sus homólogos en otras especies.











<b>Tabla suplementaria 1a: Datos completos de Apoptosis/Proliferación celular en embriones de pollo electroporados.</b>							
		WT 30 horas control	WT 30 horas electroporado	DN 30 horas control	DN 30 horas electroporado	DN 72 horas control	DN 72 horas electroporado
<b>Apoptosis</b>	Nº de especímenes	3	3	3	3	3	3
	Nº de secciones	15	16	27	30	18	18
	Nº de células Fgf8+ analizadas	401	429	1109	1103	724	596
	% células Fgf8+/sección	26,73	26,81	41,07	36,77	40,22	33,11
	Nº de células TUNEL+	15	14	61	57	36	1
	% de células TUNEL+ /sección de AER	3,74	3,26	5,50	5,17	4,97	0,16
<b>Proliferación</b>	Nº de especímenes	3	3	3	3	3	3
	Nº de secciones	22	27	29	29	25	9
	Nº de células Fgf8+ analizadas	675	779	1093	1157	1011	448
	Nº de células Fgf8+/sección	30,68	28,85	37,69	39,90	40,44	49,77
	Nº de células TUNEL+	112	125	200	193	166	96
	% de células TUNEL+/sección de AER	16,66	16,04	18,29	16,68	16,40	21,42

<b>Tabla suplementaria 1b: Datos completos de Apoptosis/Proliferación celular de Apoptosis/Proliferación en embriones de ratón.</b>			
		Ratón Arid3b <sup>+/+</sup>	Ratón Arid3b <sup>-/-</sup>
<b>Apoptosis</b>	Nº de especímenes	3	3
	Nº de secciones	55	25
	Nº de células del AER analizadas	1999	673
	Nº de células del AER/sección	36,35	26,92
	Nº de células TUNEL +	286	34
	% de células TUNEL+ por sección de AER	14,30	5,05
<b>Proliferación</b>	Nº de especímenes	3	3
	Nº de secciones	28	29
	Nº de células del AER analizadas	1035	707
	Nº de células del AER/sección	36,96	24,37
	Nº de células TUNEL +	43	13
	% de células TUNEL+ por sección de AER	4,15	1,84





# **DISCUSIÓN**

La extremidad de vertebrado es un sistema biológico complejo que requiere la correcta coordinación de numerosos procesos durante su desarrollo. Estos procesos, están sujetos a un minucioso control genético por parte de las células que conforman dicha estructura. Aunque los mecanismos moleculares encargados de la formación de la extremidad son motivo de estudio desde hace décadas, aún existen muchas incertidumbres relacionadas con las cascadas genéticas que gobiernan su organogénesis. Este trabajo de investigación se ha desarrollado con el propósito de aclarar alguna de estas cuestiones, abarcando diferentes etapas del desarrollo de la extremidad como son la morfogénesis de la cresta ectodérmica apical y la formación de la punta de los dedos.

## **1. El proyecto de genómica**

Existen numerosos estudios que demuestran un alto grado de conservación en las moléculas encargadas del desarrollo de los apéndices de *Drosophila* y las implicadas en la formación de la extremidad de vertebrado (Morata, 2001). Por este motivo se consideró que un abordaje realizado a partir de un *screening* de mutantes de *Drosophila* con fenotipo en el ala, podría desvelar la participación de nuevos homólogos en el desarrollo de la extremidad de vertebrado. El disco imaginal de ala de *Drosophila* contiene un borde de compartimento que separa la región dorsal de la ventral, encargado del crecimiento de este apéndice en el eje próximo-distal. Esta estructura podría considerarse, al menos funcionalmente, homóloga a la cresta ectodérmica apical del primordio de vertebrados. Este borde dorso-ventral, que expresa numerosos genes (entre los que podemos incluir algunos miembros de la vía de Notch) ha sido descrito únicamente en el disco imaginal de ala y halterio. Por este motivo, la elección en este *screening* de mutantes con fenotipo en el disco imaginal de ala, ha podido incrementar las probabilidades de encontrar genes asociados al AER, frente a otro tipo de abordajes basados en otros discos imaginales, como por ejemplo el de pata.

## **2. Expresión de Arid3b en el embrión de vertebrado**

Mediante la utilización de diferentes técnicas se ha descrito el patrón de expresión de *Arid3b* en el embrión de pollo y ratón a diferentes estadios. En cuanto a la metodología empleada debe destacarse las diferencias obtenidas en los estudios en el embrión de ratón con el uso de la hibridación *in situ* y la tinción con lac-Z, donde observamos una gran similitud en el patrón de expresión pero no una total equivalencia. La mayor distinción entre ambas técnicas reside en la naturaleza de la molécula detectada por cada una de ellas. Mientras que la hibridación *in situ* reconoce el RNA, la tinción lac-Z revela la presencia de la proteína formada. En numerosos casos, como es el nuestro, la proteína formada es una proteína de fusión con la  $\beta$ -galactosidasa. Esto hace que si se tratara de una molécula de secreción, el patrón de expresión con cada una de estas técnicas podría diferir completamente. Sin embargo ARID3b es un factor de transcripción que actúa en el interior de la célula que lo genera por lo que no existen

diferencias en ese respecto. Otra posible explicación a las diferencias observadas podría deberse a la alta sensibilidad y total especificidad que exhibe la tinción lac-Z con respecto al uso de la hibridación *in situ*. Aunque el uso de sondas de RNA específicas marcadas debería inequívocamente localizar los transcritos de un gen en una célula determinada, la realidad es que muy pocas sondas muestran un nivel de especificidad tan alto que evite la presencia de fondo. Sin embargo las tinciones lac-Z, únicamente dependen de la correcta permeabilización del embrión para mostrar un patrón de expresión totalmente específico. Por otro lado, se ha descrito la alta estabilidad que muestra el enzima  $\beta$ -galactosidasa. Esto provocaría que patrones dinámicos, que se extienden o se restringen con el paso de las diferentes etapas embrionarias muestren ciertas distinciones utilizando una u otra técnica. Un ejemplo de este fenómeno se puede evidenciar si estudiamos la expresión de *Arid3b* en los somitos o en el mesodermo caudal. En dichas estructuras, la expresión se va limitando a la región posterior del embrión, territorio más indiferenciado, de manera que el patrón observado por tinción lac-Z mostrará una extensión superior que el percibido mediante hibridación *in situ* en ejemplares del mismo estadio. Esto se produce debido a que detectamos la presencia de la proteína en células y áreas del embrión donde la expresión del RNA endógeno ya se ha extinguido.

*Arid3b* se expresa de manera dinámica y órgano-específica en el embrión de ratón y pollo y su estudio nos ha permitido demostrar un alto grado de homología en el patrón de expresión de este gen entre ambas especies. La inmensa mayoría de estructuras tales como romboencéfalo, algunas células migrantes de la cresta neural, sacos faríngeos y arcos branquiales, notocorda, tubo digestivo, mesonefros o tubo neural exhiben una dinámica de expresión idéntica tanto en pollo como en ratón. No obstante existen ciertas discrepancias que merecen ser resaltadas como son las encontradas en el corazón (cuyos niveles parecen ser más evidentes en ratón) o músculo de la extremidad y ganglios de las raíces dorsales (que únicamente se han logrado detectar con claridad en pollo). Por otro lado, el patrón de *Arid3b* en el embrión de pollo y ratón también comparte numerosas regiones de expresión con su homólogo en mosca, *Dead ringer*, especialmente en la faringe, el tubo digestivo, sistema nervioso o en el disco imaginal de ala (Gregory et al., 1996; Shandala et al., 1999; Shandala et al., 2002). Este grado de conservación en el patrón de expresión en diferentes especies parece subrayar la importancia de *Dead ringer* y *Arid3b* en el desarrollo embrionario.

Si llevamos a cabo una comparación entre el patrón de expresión de *Arid3b* en el embrión de ratón publicado recientemente (Takebe et al., 2006) y el obtenido en nuestro grupo se puede comprobar que es prácticamente idéntico. A pesar de ello somos capaces de evidenciar ciertas diferencias. Mediante hibridación *in situ* y tinción lac-Z hemos podido demostrar una clara expresión de este factor en el ectodermo del primordio de la extremidad, así como una restricción de esta expresión al AER en etapas posteriores. Takebe y colaboradores, en ningún caso mencionan la presencia de *Arid3b* en esta estructura. Este hecho pudiera deberse a un problema técnico ya que su estudio estaba centrado en tejidos mesenquimales, por lo que un aumento en la agresividad del tratamiento de permeabilización, para permitir la entrada de la sonda a estructuras internas del embrión, podría debilitar el ectodermo, impidiendo la detección de *Arid3b* en este tejido.

En cuanto al patrón descrito en el corazón, este grupo se limita a mostrar la expresión de *Arid3b* en el tracto de salida empleando la hibridación *in situ*, resultados parecidos a

los obtenidos en el laboratorio usando esta técnica. No obstante, al utilizar tinción lac-Z en embriones *Arid3b*<sup>+/-</sup> fuimos capaces de detectar altos niveles de *Arid3b* en la totalidad del miocardio cardíaco.

Por otro lado, aunque el patrón de expresión en la totalidad del tubo neural de la región caudal ha sido descrito, nada se menciona sobre la señal detectada en el floorplate y en la notocorda a lo largo del eje antero-posterior. Además tampoco se menciona la expresión en los mesonefros o en el dermomiótomo.

Curiosamente, la construcción empleada en el mutante para *Arid3b* publicado por este grupo japonés posee el gen de la  $\beta$ -galactosidasa en el locus de este gen por lo que podrían emplear la tinción lac-Z en embriones heterocigotos como herramienta para determinar con mayor exactitud el patrón de este factor, sin embargo, no muestran figuras usando dicha técnica.

Por último se quiere subrayar que, pese la presencia de altos niveles de *Arid3b* en numerosas regiones del embrión, se puede destacar un enriquecimiento de este factor en epitelios complejos con un alto grado de estructuración, como pueden ser la cresta ectodérmica apical, el tubo neural, diferentes epitelios en el tubo digestivo o el dermomiótomo del somito. Estos epitelios especializados sufren, en su mayoría, cambios conformacionales, o morfológicos que implican un proceso de maduración o morfogénesis por lo que el patrón de *Arid3b* en estas estructuras podría apuntar a un papel de dicho factor en este tipo de procesos.

### **3. Expresión de *Arid3b* en el primordio de la extremidad de vertebrado**

Se ha llevado a cabo un análisis detallado del patrón de expresión de *Arid3b* en el primordio de la extremidad de pollo y ratón. Los resultados descritos han mostrado que este patrón se encuentra muy conservado en ambas especies y presenta un alto grado de dinamismo, comenzando en todo el ectodermo, restringiéndose a la región ventral y posteriormente localizándose en la cresta ectodérmica apical. En el embrión de pollo se ha comparado temporalmente la aparición de *Arid3b* con otros marcadores en el primordio y se ha mostrado que este factor comienza a detectarse a estadio 16-17HH después de *Sp8* y antes de *Fgf8* en el ectodermo de esta estructura. Este resultado demuestra que no es una molécula que se exprese en etapas muy tempranas durante la inducción del primordio pero lo hace previamente a marcadores más tardíos como *Fgf8*.

Además se ha estudiado la disposición espacial de este factor a lo largo del desarrollo embrionario, en comparación con diferentes moléculas expresadas en el ectodermo del primordio, especialmente marcadores dorso-ventrales. Dichos ensayos demostraron una pequeña diferencia entre el patrón de expresión en el embrión de pollo y en el de ratón. En el pollo, la desaparición de *Arid3b* en la mitad dorsal del ectodermo, especialmente en la región próxima al AER es menos marcada que en el ratón. En esta última especie, la expresión de *Arid3b* se hace prácticamente indetectable en dicho ectodermo. Este hecho podría estar relacionado con los diferentes orígenes de la cresta ectodérmica apical en una y otra especie.

Asimismo se ha podido observar que *Arid3b*, una vez se limita al ectodermo ventral, empieza a adoptar un patrón de expresión muy similar al descrito para *Fgf8*, coincidiendo con la formación del AER. Esta expresión abarca la totalidad de la cresta



ectodérmica apical en todo su eje antero-posterior y no se restringe a la parte posterior tal y como ocurre con el resto de FGFs expresados en esta estructura. Por otra parte, la realización de diferentes manipulaciones que afectan la integridad o extensión de la cresta ectodérmica apical del embrión de pollo, así como la inducción de esta estructura, llevan asociados cambios en los niveles o en la disposición de *Arid3b*. Todos estos datos sugieren que *Arid3b* puede ser considerado un buen marcador de AER.

#### **4. Clonaje del homólogo de Arid3b en el embrión de pollo**

Una vez analizado el patrón de expresión de *Arid3b*, se llevó a cabo una serie de experimentos que nos permitieron conocer la función de dicho gen durante el desarrollo de la extremidad. Uno de los abordajes realizados incluía la sobreexpresión de la forma silvestre de *Arid3b* en el ectodermo la citada estructura. Un requisito previo a la hora de efectuar estos ensayos era el clonaje del cDNA de este factor en dicha especie en un vector de expresión. El fragmento obtenido resultó ser único, con idéntico tamaño y secuencia en los numerosos clones analizados. Esto, unido a la ausencia de transcritos alternativos en otras especies apuntaba a que, posiblemente, el fragmento conseguido era la única variante existente en el pollo.

Cuando se analizó la secuencia clonada se pudo observar un alto grado de conservación con respecto a sus homólogos en otros vertebrados y en menor medida con *Drosophila melanogaster*. Esta homología se incrementa notablemente en el dominio ARID, lo que sugiere una alta conservación funcional.

#### **5. Ensayos de ganancia de función en el embrión de pollo**

Hemos descrito cómo los estudios de sobreexpresión de la forma silvestre de *Arid3b* en el ectodermo prospectivo de la extremidad en el embrión de pollo se traducen en un defecto en la morfología de la cresta ectodérmica apical. Resulta destacable el altísimo porcentaje, cercano al 100%, de embriones que muestran a la vez alta eficiencia de electroporación y un fenotipo evidente en el primordio. Este hecho parece indicar una alta susceptibilidad de este tejido a unos niveles elevados de *Arid3b* y un papel decisivo de este gen en la organización de dicha estructura. Curiosamente, la proporción de embriones recogidos con fenotipo a tiempos largos, cinco a nueve días postelectroporación, se vio fuertemente disminuida. Este hecho es fácilmente explicable, ya que a dicho tiempo, los niveles de GFP son indetectables por lo que todos los embriones supervivientes son recogidos. Estos incluyen tanto a los ejemplares que se han electroporado eficientemente como a los que no.

Como hemos analizado, la desorganización del AER mostrada tras estos ensayos, se manifiesta de modos diferentes en la morfología de esta estructura. Así pues, podemos encontrar desde prolongaciones de cierta extensión de la cresta ectodérmica apical, es decir, presencia ectópica de AERs y *Fgf8*, hasta una abolición parcial de la misma. Interesantemente, se han observado células con altos niveles de GFP/*Arid3b* asociadas a la presencia tanto de regiones con AERs ectópicos como de ausencia de

AER. Una posible explicación a dicho fenómeno podría estar relacionada con un efecto cuantitativo, es decir, con el número de células que sobreexpresan el factor. Esta posibilidad sugeriría que la presencia de un mayor o menor número de células provocarían la aparición de una u otra variante. No obstante, y sin haber realizado un estudio exhaustivo, no se han encontrado diferencias aparentes en el número de células GFP-positivas. Por otro lado se podría explicar mediante un efecto cualitativo, es decir, del tipo de célula donde se sobreexpresa *Arid3b*. Esta posibilidad apuntaría a que la identidad de la célula, otorgada por su maquinaria celular, posición dentro del tejido y relación con las propias células que la rodean en el momento de la electroporación, modularía su respuesta a la presencia de *Arid3b*. Asimismo, tanto la variación en los niveles de *Arid3b* expresados por el plásmido, como la posibilidad de que estos factores de transcripción actúen tanto como activadores como represores en diferentes sistemas (Hader et al., 2000; Shandala et al., 1999; Valentine et al., 1998), le añade un grado más de complejidad que podría esclarecer los diferentes efectos mostrados. Por último no se puede descartar la existencia de efectos autónomos celulares como no autónomos celulares sobre células vecinas.

## **6. Ensayos de pérdida de función en el embrión de pollo**

Para los estudios de pérdida de función en el embrión de pollo, se llevó a cabo la electroporación en el ectodermo de la extremidad prospectiva de formas dominantes negativas de *Arid3b*, así como morfollinos específicos contra esta molécula.

En cuanto a las construcciones empleadas como formas dominantes negativas, debemos reconocer que no se ha realizado ningún tipo de ensayo directo para comprobar que estas variantes actúan como tal. Sin embargo, existen evidencias sólidas que sugieren que así es. Por un lado, construcciones que presentan modificaciones idénticas en otros homólogos (*Dead ringer* y *Bright/Arid3a*), han sido validadas como dominantes negativas en ensayos *in vivo* e *in vitro* (Nixon et al., 2004; Rajaiya et al., 2006; Shandala et al., 2002). Asimismo, el fenotipo obtenido en el primordio mediante su electroporación coincide mayormente con el contemplado en otros estudios de falta de función como son los morfollinos o el ratón mutante *Arid3b*<sup>-/-</sup>. Además, la presencia de un único fenotipo empleando ambas variantes parece indicar que muy seguramente, estas construcciones actúen como formas dominantes negativas.

La electroporación de cArid3b<sub>DNRW</sub> o de cArid3b<sub>DNY312A</sub> provocó un fenotipo muy homogéneo que se correspondía a la formación de crestas ectodérmicas apicales con borde irregular, ensanchadas en el eje dorso-ventral y reducidas en el eje antero-posterior. Al mismo tiempo dichos AERs mostraban un grado alto de desestructuración y un menor número de alturas celulares, indicando un menor nivel de madurez. Curiosamente, sólo la mitad de los embriones electroporados eficientemente exhiben un fenotipo claro. Esto podría deberse a que la electroporación de la formas dominantes negativas, en células del ectodermo prospectivo que no van a dar lugar al AER, podrían no causar ningún tipo de fenotipo. No obstante la presencia de células electroporadas en la cresta ectodérmica apical de algunos ejemplares sin fenotipo aparente, parecen descartar esta hipótesis. Una vez más, un efecto cuantitativo, la naturaleza de las células diana de la sobreexpresión o efectos no autónomos celulares podrían explicar este fenómeno.

## **7. Ensayos de pérdida de función en el embrión de ratón**

La generación de un mutante de falta de función de *Arid3b* nos ha permitido validar los experimentos realizados en el embrión de pollo y estudiar la función de este factor de transcripción en otras estructuras en desarrollo. Así pues parece que el fenotipo mostrado por el mutante *Arid3b*<sup>-/-</sup> ha confirmado la importancia de esta molécula en numerosos procesos durante la formación del embrión de ratón ya que es letal embrionario. Además, como es lógico, parece existir un alto grado de concordancia entre el fenotipo observado y el patrón de expresión descrito para este gen tal y como demuestran las alteraciones en estructuras craneofaciales, tubo neural, extremidades o corazón. Una clara excepción se encontró en las anomalías observadas en los vasos sanguíneos, estructuras en las que no se ha detectado expresión de *Arid3b* pero sí un evidente defecto. Este fenotipo se puede explicar por un defecto en el proceso de remodelación de los vasos provocado por un deterioro del corazón. La remodelación de la vasculatura es una de la últimas etapas en el desarrollo de los vasos que responde a estímulos fisiológicos como son frecuencia y velocidad de latido o la presión sanguínea. Estos eventos podrían estar comprometidos debido a los fallos cardíacos originados por la ausencia de *Arid3b*. Estos defectos en el corazón parecen producirse a la hora de distribuir la sangre, ya que aunque este órgano es capaz de latir, no somos capaces de distinguir circulación alguna en el interior del embrión. Un hecho a destacar es la presencia de cúmulos de sangre en estos especímenes, en numerosas ocasiones también en el primordio de la extremidad.

Por otro lado, resultaría muy interesante estudiar en detalle estructuras tales como los mesonefros, somitos, notocorda o tubo neural dónde la expresión de *Arid3b* muestra niveles muy elevados.

Unos de los mayores problemas a los cuales nos hemos enfrentado a la hora de analizar el fenotipo del mutante *Arid3b*<sup>-/-</sup> ha sido, en primer lugar, su letalidad embrionaria y en segundo lugar su evidente retraso en el crecimiento. La primera contrariedad nos ha imposibilitado el estudio de *Arid3b* en procesos tardíos de diferenciación, así como descubrir una posible función de este gen en la formación de estructuras tales como el oído, sistema nervioso, cristalino ocular, los orificios nasales o el tubérculo genital. Asimismo, la muerte de los embriones a estadio E10.5, aunque nos ha permitido estudiar muchos de los factores implicados en la formación del primordio de la extremidad, nos ha limitado a la hora de analizar otros eventos en la formación de este apéndice. Igualmente nos ha impedido poner de manifiesto la evolución del fenotipo descrito en la cresta ectodérmica apical y las posibles afectaciones del patrón esquelético ocasionado por dicho fenotipo. Este análisis se pretende llevar a cabo en el laboratorio mediante la generación de un mutante condicional para *Arid3b*.

A continuación pasaremos a relatar las diferencias encontradas entre el fenotipo del mutante de falta de función generado en nuestro laboratorio y el detallado por Takebe y colaboradores. En primer lugar podemos indicar que la viabilidad del mutante publicado es superior a la observada en nuestros experimentos, mostrando en su caso un número de mutantes similar al esperado por probabilidad mendeliana a estadio E10.5. Asimismo en esta publicación, aunque se describe un incremento de la letalidad del embrión a estadio E11.5, todavía se recuperan ejemplares vivos incluso a estadio E12.5. En nuestro caso, el número de embriones recolectados a estadio E10.5

únicamente alcanzó la mitad de los esperados y prácticamente nunca se obtuvieron especímenes más avanzados. Desconocemos actualmente la causa real por la que el mutante generado en nuestro laboratorio parece mostrar un fenotipo más severo que el descrito por Takebe y colaboradores, aunque pensamos que este fenómeno podría deberse al abordaje genético llevado a cabo en cada caso. En el mutante publicado, el primer exón es sustituido por una construcción que incluye un IRES (internal ribosome entry site) más el gen que codifica para la  $\beta$ -galactosidasa. De esta manera, absolutamente ningún fragmento del gen *Arid3b* se llega a expresar. En el mutante creado en nuestro laboratorio, la eliminación del gen se llevó a cabo mediante una mutación insercional (*gene-trap*). Así pues, el vector de *gene-trap* que contiene la  $\beta$ -galactosidasa se insertó en alguna región del intrón<sub>1</sub>, permitiendo la expresión del exón<sub>1</sub>. Aunque aparentemente a este exón no se le ha relacionado con ninguna función concreta, no se han realizado ensayos específicos para demostrar un posible papel dentro de la actividad de *Arid3b*. Por este motivo, y basándonos únicamente en el aumento en la severidad del fenotipo, así como los defectos en el primordio de la extremidad, podríamos hipotetizar que la expresión de una forma residual truncada de ARID3b en nuestro mutante, podría estar actuando de forma dominante negativa. Esta molécula secuestraría parte de los posibles factores asociados, impidiendo su interacción con otras proteínas y produciéndose un fenotipo más extremo.

El grupo japonés atribuye la muerte del embrión a la presencia de un menor número de células encargadas de la formación del campo secundario del corazón. De esta manera, el reclutamiento de un número insuficiente de estas células por parte del corazón provocaría defectos en el desarrollo de dicho órgano que causaría alteraciones en la remodelación de los vasos sanguíneos. Este fenotipo cardiovascular, posible responsable de la muerte del embrión, se produciría de manera no-autónoma celular ya que no consiguieron detectar expresión de *Arid3b* en el corazón ni en los vasos sanguíneos. Desde nuestro punto de vista, los defectos observados en corazón no se producirían por el fenómeno descrito en dicha publicación ya que pueden ser detectados a estadios cercanos a E.9.5, etapa embrionaria en la que las células del campo secundario aún no han sido incorporadas al corazón. Al mismo tiempo, en el laboratorio se ha descrito la presencia de altos niveles de este gen en el miocardio por lo que no deberíamos descartar un efecto autónomo celular en este órgano. No obstante compartimos la explicación en torno a la procedencia del fenotipo en la vasculatura.

Por otro lado, dicho grupo no evidencia ningún tipo de alteración en el desarrollo de la extremidad, mientras que en nuestro laboratorio se ha descrito una grave malformación de la cresta ectodérmica apical. Dicho fenotipo recuerda en cierto modo al obtenido tras la electroporación, en el embrión de pollo, de cualquiera de las formas dominantes negativas o morfollinos.

Desconocemos actualmente la causa real por la que el mutante generado en nuestro laboratorio parece mostrar un fenotipo más severo que el descrito por Takebe y colaboradores, aunque pensamos que este fenómeno podría deberse al abordaje genético llevado a cabo en cada caso. En el mutante publicado, el primer exón es sustituido por una construcción que incluye un IRES (internal ribosome entry site) + el gen que codifica para la  $\beta$ -galactosidasa. De esta manera, absolutamente ningún fragmento del gen *Arid3b* se llega a expresar. En el mutante creado en nuestro laboratorio, la eliminación del gen se llevó a cabo mediante una mutación insercional (*gene-trap*). Así pues, el vector de *gene-trap* que contiene la  $\beta$ -galactosidasa se insertó en alguna región del intrón<sub>1,2</sub>, permitiendo la expresión del exón<sub>1</sub>. Aunque

aparentemente a este exón no se le ha relacionado con ninguna función concreta, no se ha realizado ensayos específicos para demostrar un posible papel dentro de la actividad de *Arid3b*. Por este motivo, y basándonos únicamente en el aumento en la severidad del fenotipo, así como los defectos en el primordio de la extremidad, podríamos hipotetizar que la expresión de una forma residual truncada de ARID3b en nuestro mutante, podría estar actuando de forma dominante negativa. Esta molécula secuestraría parte de los posibles factores asociados, impidiendo su interacción con otras proteínas y produciéndose un fenotipo más extremo.

## **8. *Arid3b* en la formación de la extremidad de vertebrado**

Hemos detallado cómo los ensayos de ganancia y pérdida de función de *Arid3b* generan defectos en la formación de la cresta ectodérmica apical. Además, previamente se han descrito numerosos genes implicados en la inducción, localización y estructuración del AER cuya alteración han provocado anomalías en esta estructura. Por este motivo, se han llevado a cabo experimentos para comprobar la posible participación de *Arid3b* en alguna de estas vías de señalización.

### **8.1 *Arid3b* no parece involucrado en la vía que establece la inducción de la cresta ectodérmica apical**

La cascada de inducción de la cresta ectodérmica apical permite la generación de precursores del AER y la expresión por parte de este grupo de células de *Fgf8*, marcador por excelencia de esta estructura.

Tanto los ratones *Arid3b*<sup>-/-</sup> como los embriones de pollo electroporados con las formas dominantes negativas o morfolinós presentan una morfología aberrante del AER, sin embargo la expresión de *Fgf8* se inicia con normalidad. Por otro lado la sobreexpresión de la forma silvestre, pese a producir alteraciones en la cresta ectodérmica apical endógena, no parece inducir ectópicamente *Fgf8*, ya que en numerosas ocasiones se observaron grandes parches de electroporación en el ectodermo prospectivo pero no se detectó la aparición de este marcador. Únicamente en dos casos aislados, de cincuenta embriones analizados, se encontraron células GFP-positivas capaces de expresar *Fgf8* separadas del AER endógeno. Este hecho puede ser interpretado más que como una activación ectópica de *Fgf8*, como un defecto grave en el proceso de maduración de ciertas células consideradas pre-AER que han visto trastornado su proceso de organización y no han podido alcanzar su localización en el borde dorso-ventral. El resto de ejemplares que expresaban *Fgf8* de manera ectópica mostraban una prolongación del AER endógeno por lo que esta circunstancia apoya dicho planteamiento.

Por otro lado *Fgf8* se inicia tras la activación de *Fgf10* en el mesénquima (Min et al., 1998; Ohuchi et al., 1997; Sekine et al., 1999) y la posterior inducción de la vía de Wnts (Barrow et al., 2003; Galceran et al., 1999; Kengaku et al., 1998; Soshnikova et al., 2003) y el factor de transcripción Sp8 (Bell et al., 2003; Kawakami et al., 2004; Treichel et al., 2003) en el ectodermo de la extremidad prospectiva. Análisis realizados en mutantes *Arid3b*<sup>-/-</sup> demuestran que tanto *Fgf10* como Sp8 se expresan con normalidad en estos especímenes. Además

*Msx 2*, también relacionado con la inducción de la cresta ectodérmica apical (Pizette et al., 2001), muestra un patrón comparable a las muestras control.

De esta manera, aunque no podemos descartar totalmente una posible interacción de *Arid3b* con la vía encargada de la iniciación del AER, podemos afirmar que este gen ni es necesario ni suficiente para inducir la expresión de *Fgf8* en el primordio de la extremidad.

El proceso de mantenimiento que permite la expresión prolongada de *Fgf8* en la cresta ectodérmica apical incluye a muchos de los componentes de la vía de inducción de este centro de señalización. Con los experimentos realizados actualmente no podemos descartar una potencial intervención de *Arid3b* en este proceso. La temprana letalidad embrionaria del mutante de falta de función, y los bajos niveles de expresión a estadios tardíos observados en embriones de pollo electroporados, nos impiden determinar si *Arid3b* pudiera actuar a este nivel, contribuyendo a los bucles de retroalimentación que mantienen el AER.

## **8.2 Arid3b no parece involucrado en la vía que establece el patrón dorso-ventral**

La cascada de señalización implicada en la formación de un correcto eje dorso-ventral en el primordio, ha sido a su vez relacionada con un adecuado posicionamiento de la cresta ectodérmica apical. Asimismo variaciones en los niveles de expresión de algunos de sus miembros han provocado una localización inapropiada de esta estructura exhibiendo un AER de morfología aberrante. Este es el caso observado tras la sobreexpresión de *Engrailed1* o *Radical Fringe* en el ectodermo del primordio del embrión de pollo, cuya cresta ectodérmica apical muestra un borde irregular (Laufer et al., 1997; Logan et al., 1997; Rodríguez-Esteban et al., 1997). Aunque este fenotipo resulta muy similar al obtenido en el laboratorio en los embriones electroporados con la forma wt de *Arid3b*, existen evidencias que descartan con cierta contundencia un papel de *Arid3b* en la cascada de formación del patrón dorso-ventral. El primer indicio reside en el patrón de expresión de este gen, el cual no se asemeja al observado en otros componentes de esta vía, como son *Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp7*, *En1*, *Wnt7a* o *R-Fng*. Normalmente estos genes aparecen totalmente restringidos a la región dorsal o ventral, si no durante todo el desarrollo del primordio, al menos en las etapas más tempranas. Además los ensayos de ganancia y pérdida de función en estos genes suelen provocar cambios en el patrón dorso-ventral. Estos cambios aparecen asociados a una alteración en la expresión de marcadores de esta vía, y su resultado es la transformación parcial de la identidad dorso-ventral en los casos más leves, o la aparición de extremidades bidorsales o biventrales en los casos más graves (Ahn et al., 2001; Chen et al., 1998; Logan et al., 1997; Loomis et al., 1996; Loomis et al., 1998; Parr and McMahon, 1995; Pizette et al., 2001; Riddle et al., 1995; Vogel et al., 1995). En el caso de *Arid3b*, la sobreexpresión tanto de la forma wt como de las formas dominantes negativas en el embrión de pollo y la eliminación genética en el ratón no han mostrado variaciones en el patrón de expresión de moléculas implicadas en la vía dorso-ventral. Asimismo, en los ensayos realizados con pollo y recogidos a tiempos muy largos no se han evidenciado ningún tipo de transformación en la identidad dorso-ventral de las

extremidades formadas incluyendo los elementos ectópicos generados. Por otro lado, la manipulación genética de componentes de esta vía, como son el mutante *Enl*<sup>-/-</sup>, o la sobreexpresión de *R-Fng* y *Enl* en el embrión de pollo provoca la extensión de la cresta ectodérmica apical hacia el ectodermo ventral en los dos primeros ejemplos y hacia el ectodermo dorsal en el último. Dichas anomalías provocan la aparición de sobrecrecimientos en la región ventral o dorsal respectivamente de manera invariable. En nuestros experimentos, la presencia de altos niveles de *Arid3b* promueve la extensión del AER hacia ambos ectodermos y una subsecuente formación de sobrecrecimientos a ambos lados, es decir no existe una restricción dorso-ventral clara.

Existe cierta controversia en torno a la necesidad de un borde dorso-ventral para la correcta formación de la cresta ectodérmica apical. Se conoce que la aposición mediante transplantes de un ectodermo dorsal y uno ventral provoca la aparición de un AER ectópico en el nuevo primordio (Laufer et al., 1997; Tanaka et al., 1997) mientras que el mismo experimento con dos ectodermos dorsales no produce este efecto. Además el fenotipo del ratón mutante de falta de función de *Enl* así como los mutantes de pollo *limbless* y *wingless* y el de ratón *legless* no establecen un correcto patrón dorso-ventral y presentan anomalías en la formación de la cresta ectodérmica apical (Bell et al., 1998; Fallon et al., 1983; Grieshammer et al., 1996; Loomis et al., 1996; Loomis et al., 1998; Noramly et al., 1996; Ohuchi et al., 1997; Ros et al., 1996). En contraposición a estos resultados se han reunido un considerable número de evidencias que parecen indicar que la presencia de este borde no resulta indispensable. Una de estas pruebas viene dada tras el transplante de regiones prospectivas de extremidad a la zona dorsal del tubo neural. Los primordios generados exhiben una evidente bidorsalidad, no obstante el AER formado es normal (Michaud et al., 1997). Asimismo, estudios de ganancia y pérdida de función de *Wnt7a* y *Lmx1b* tanto en el embrión de pollo como de ratón presentan deficiencias en el patrón dorso-ventral, pero la morfología y localización de la cresta ectodérmica apical no se ve afectada (Riddle et al., 1995) (Chen et al., 1998; Parr and McMahon, 1995; Vogel et al., 1995). Además, el fenotipo mostrado en la cresta ectodérmica apical por parte del ratón mutante de falta de función de *Enl* puede rescatarse tras la eliminación genética de *Wnt7a* (Kimmel et al., 2000; Loomis et al., 1998). Por otra parte, los AERs ectópicos que se forman de manera natural en el mutante de pollo euploidía no son flanqueados por un ectodermo dorsal y ventral (Carrington and Fallon, 1986; Fraser and Abbott, 1971). Todas estas evidencias podrían apuntar a que no es necesaria la presencia de un borde dorso-ventral, establecido por estos marcadores, para la correcta formación de la cresta ectodérmica apical. Por lo que a nuestros datos respecta, los resultados obtenidos en esta tesis doctoral parecen sustentar esta última posibilidad, ya que a cada lado de los AERs ectópicos obtenidos en los ensayos de sobreexpresión de la forma wt de *Arid3b* en el embrión de pollo, no se detecta un borde dorso-ventral molecularmente hablando.

### **8.3 Arid3b parece no interaccionar genéticamente con Serrate2 ni Dkk1 para establecer una correcta morfología del AER**

Los ensayos de pérdida de función tanto en pollo como en ratón originan una cresta ectodérmica apical ensanchada en el eje dorso-ventral y más corta en el eje antero-posterior, con evidentes defectos morfológicos. Este fenotipo recuerda, en cierto modo, al observado en el ratón mutante condicional de *Notch1* (Francis et al., 2005; Pan et al., 2005), así como al modelo KO para *Serrate2* o al mutante hipomorfo también para *Serrate2*, *syndactylism* (Jiang et al., 1998; Sidow et al., 1997). En estos especímenes el AER se encuentra también extendido en el borde dorso-ventral, se introduce en el mesénquima y presenta un aspecto hiperplásico a partir de estadio E10.5. La aparición de este AER se produce por una disminución en los niveles apoptóticos requeridos para la correcta conformación de esta estructura. Para determinar una posible interacción entre la vía de Notch y *Arid3b*, se analizó el patrón de expresión de *Serrate2/Jagged2* en mutantes homocigotos *Arid3b*<sup>-/-</sup>. No se observaron diferencias en los ejemplares analizados con respecto a los embriones control. Por otro lado, los fenotipos obtenidos en los ensayos de electroporación con las formas dominantes negativas, y recogidos a tiempos largos, no mostraron un fenotipo similar al descrito para los mutantes de la vía de Notch. Mientras que en los primeros se evidenciaron mayormente truncaciones con elementos ectópicos en estos últimos predominan las sindactilias con elementos distales fusionados. Además, el aspecto que muestra el AER hiperplásico en los mutantes de la vía de Notch desde estadios tempranos no concuerda con las primeras etapas en la formación de la cresta ectodérmica apical que observamos en nuestros experimentos, en los que esta estructura exhibe un aspecto aplanado. Por otro lado, y pese a detectar niveles de apoptosis inferiores en el AER de los mutantes *Arid3b*<sup>-/-</sup>, también la proliferación se ve severamente perturbada, por lo que consideramos que la causa que desencadena el fenotipo no es una alteración en estos valores. Por estas razones consideramos que probablemente la vía de Notch no se encuentra afectada en los ensayos de pérdida de función de este factor.

Otro gen, cuya eliminación origina un fenotipo en el primordio, similar a la falta de función de *Arid3b*, es *Dkk1*, un inhibidor de la vía de Wnts. Tanto el ratón mutante total como el mutante hipomorfo, conocido como *doubleridge*, tienen una cresta ectodérmica apical expandida en el eje dorso-ventral pero el patrón molecular en este eje no está afectado (Adamska et al., 2003; Adamska et al., 2004; Grotewold and Ruther, 2002; MacDonald et al., 2004; Mukhopadhyay et al., 2001). El resultado de esta anomalía es la aparición de dedos ectópicos y una marcada sindactilia. Una clara diferencia entre los mutantes para *Dkk1* y los ensayos de falta de función realizados en nuestro laboratorio reside en que, a estadios avanzados, los dedos ectópicos en el mutante *Dkk1*<sup>-/-</sup> aparecen en el mismo plano que el resto de dígitos, mientras que en los especímenes electroporados con las formas dominante negativas, estos dedos aparecen en un plano diferente, bien en la región dorsal o en la ventral. Asimismo, en los experimentos de sobreexpresión en pollo, *Dkk1* provoca la eliminación de la cresta ectodérmica apical y causa truncaciones en etapas posteriores. Por el



contrario, la sobreexpresión de *Arid3b* produce un AER desorganizado que se traduce en la aparición tanto de elementos ectópicos como de truncaciones. Pese a estos contrastes y con el objetivo de identificar una posible conexión entre *Arid3b* y *Dkk1*, se analizó el patrón de expresión de este último en mutantes de falta de función *Arid3b*<sup>-/-</sup>. No se pudo detectar ninguna variación en la expresión de este gen con respecto a los ejemplares control.

Con todas estas evidencias podemos indicar que el mecanismo de acción por el que *Arid3b* controla la estructuración de la cresta ectodérmica apical probablemente no incluya a *Serrate2* o *Dkk1*. No obstante, no podemos descartar una interacción genética estas vías que implique a *Arid3b* downstream de estas moléculas.

#### **8.4 Arid3b no interacciona con Shh en la formación del primordio pero sí lo hace durante el desarrollo del tubo neural**

Los experimentos realizados tanto en ratones mutantes de falta de función de *Arid3b* como de *Shh* sugieren que no existe ningún tipo de interacción entre ambas moléculas en el proceso de formación de la extremidad. Por otro lado, aunque *Arid3b* es detectable en la notocorda y en el tubo neural de la región caudal de los mutantes *Shh*<sup>-/-</sup>, se ha observado una ausencia de *Arid3b* tanto en la notocorda como en el floorplate en la región anterior de estos ejemplares. Esto nos ha llevado a sugerir un posible papel de *Shh* en el mantenimiento de *Arid3b* en el tubo neural maduro. Se sabe que, momentos previos a la generación del patrón dorso-ventral en el tubo neural, *Shh* se expresa intensamente en la notocorda. Dicha expresión es capaz de inducir altos niveles de esta misma molécula en el floorplate del tubo neural. La secreción de SHH por parte del floorplate determina el patrón dorso-ventral del tubo neural y establece, finalmente, la identidad de sus neuronas (Placzek and Briscoe, 2005). Por este motivo también podríamos proponer un papel de *Arid3b* en el establecimiento del patrón dorso-ventral del tubo neural mediado por SHH así como de la especificación de las neuronas V3 o de las motoneuronas situadas en las regiones más ventrales. Estudios posteriores deberán demostrar el posible papel en dicho proceso.

#### **8.5 Arid3b no parece controlar los niveles de muerte/proliferación en la cresta ectodérmica apical.**

Para determinar si el fenotipo observado en la cresta ectodérmica apical en los ensayos funcionales se producía debido a una alteración en los niveles de apoptosis o proliferación, se analizaron estos procesos celulares en el AER. Los embriones de ratón *Arid3b*<sup>-/-</sup> exhibieron un 64% menos de muerte y un 56% menos de proliferación que los individuos controles por lo que la relación muerte/proliferación globalmente se mantiene en valores similares al control. Por otro lado, a tiempos cortos (30 horas), durante la inducción y maduración del AER, tanto los embriones de pollo que sobreexpresan la forma silvestre como lo que sobreexpresan las formas dominantes negativas no mostraron diferencias en estos valores. Estos resultados parecen confirmar que un

desequilibrio entre la tasa de muerte y proliferación no parece ser el principal causante del fenotipo observado en la cresta ectodérmica apical. Curiosamente, ejemplares electroporados con cArid3b<sub>Y312A</sub> y cArid3b<sub>DNhW</sub> y recogidos a 72 horas, presentan un descenso muy marcado en los niveles de apoptosis y un aumento evidente pero no estadísticamente significativo, en la tasa proliferativa. Este dato podría sugerir que esta es la causa del AER hiperplásico observado. Sin embargo esta posibilidad no parece plausible ya que en el tiempo analizado el fenotipo en la cresta ectodérmica apical se encuentra totalmente establecido desde hace al menos un día. De esta manera, sabiendo que el fenotipo es detectable a 48 horas post-electroporación, las causas que lo originan deberían actuar horas antes, y en esos especímenes, los niveles de muerte y proliferación son normales. Además en los embriones recolectados a 72 horas la expresión de GFP y muy probablemente de Arid3b, procedente de la construcción, es minoritaria. Actualmente no podemos descartar efectos posteriores en homeostasis celular del AER causados por variaciones en los niveles de Arid3b. Sin embargo interpretamos la reducción en la tasa de apoptosis observada como un reflejo de la ausencia de un AER normal, maduro y con equilibrio celular correctamente establecido

## **8.6 Arid3b controla la correcta maduración y estructuración de la cresta ectodérmica apical**

Con el objetivo de analizar la estructura histológica del AER se han llevado a cabo diferentes ensayos inmunohistoquímicos en embriones de pollo electroporados con las formas dominantes negativas recogidos a 72 horas y embriones mutantes de falta de función Arid3b<sup>-/-</sup> a estadio E10.5. En el caso del pollo se detectó un menor número de estratos celulares en su cresta ectodérmica apical, mayoritariamente formando un epitelio cuboidal simple, que se extiende en mayor superficie pero que no alcanza la conformación típica del AER. El defecto primario sería, pues, morfogénético y no debido a la homeostasis en el número de células. En el embrión de ratón, y de manera similar, la cresta ectodérmica apical muestra un menor número de capas celulares y además, un porcentaje variable de las células que la forman presentan una disposición alargada de aspecto inmaduro, similar al observado en el pre-AER ventral temprano. Este dato parece indicar un defecto en la maduración de las células así como en la organización de las mismas para dar lugar a una estructura compleja como es el AER. No obstante, pese a que la capacidad de organización de estas células parece alterada, los embriones de pollo electroporados con las formas dominantes negativas y recogidos a 72h presentan una capacidad proliferativa normal y, prácticamente, una total ausencia de apoptosis. De manera similar, aunque los niveles de muerte y proliferación se encuentran reducidos en el mutante Arid3b<sup>-/-</sup> existe un pequeño desequilibrio capaz de provocar un aumento en el número de células en estadios posteriores. Por este motivo, la cresta ectodérmica apical en embriones recogidos posteriormente muestra un número de capas similar o, en la mayoría de los casos, superior al control, con un número de células Fgf8-positivas aparentemente aumentado. Sin embargo el fenotipo más evidente es que estas capas se disponen anómalamente sin alcanzar la disposición esperada. Destacamos especialmente los resultados obtenidos en embriones de pollo

recogidos a 80 horas postelectroporación en los que se han llegado a obtener AERs poliestratificados con más de diez capas celulares cuando en la naturaleza adopta una disposición de epitelio pseudoestratificado. Sorprendentemente, el grado de desorden en algunos especímenes es tal, que su cresta ectodérmica apical, en ocasiones, se introduce en el interior del mesénquima subyacente o desarrolla estructuras tubulares completamente aberrantes. De manera similar, en embriones de ratón extraídos con vida a día 11-11.5 de desarrollo, se han evidenciado un número de capas exagerado constituyendo la cresta ectodérmica apical. En algún caso, este AER se internaliza en el mesénquima adoptando una conformación totalmente anómala. Un hecho inesperado es, que pese a presentar este tipo de morfología, estos AERs son capaces de mantener la expresión de *Fgf8* y, en el caso del embrión de pollo, permitir el crecimiento de la extremidad. En algunos de los especímenes electroporados se ha detectado ausencia de *Fgf8* en la parte distal de la cresta ectodérmica apical aberrante. Estos AERs anómalos pueden llegar a mostrar entre 10 y 20 capas celulares, por lo que este hecho podría interpretarse por un defecto en el mantenimiento de este factor por parte de *Fgf10* en el mesénquima, provocado por la exagerada distancia celular entre la parte distal del AER y la fuente de FGF10. De la misma manera, en la región distal de algunas de las estructuras tubulares encontradas, no se observó expresión de *Fgf8*.

La posibilidad de que el papel de *Arid3b* resida en el control de la maduración y estructuración de las células podría verse reforzado al estudiar el patrón de expresión de este factor durante el desarrollo embrionario. Como ya hemos discutido, *Arid3b* se expresa en numerosos epitelios especializados, que a menudo alcanzan conformaciones complejas y que padecen reorganizaciones y procesos que agrupan cambios estructurales diversos. Asimismo sería interesante estudiar el patrón de expresión de este gen en pez cebra, proyecto el cual se empezó a realizar durante esta tesis doctoral.

Si analizamos a nivel celular los ensayos de ganancia y pérdida de función en el embrión de pollo se puede deducir que pese a un evidente efecto autónomo celular provocado por la sobreexpresión de las diferentes construcciones, existe un efecto no-autónomo celular en las células colindantes. Tras la sobreexpresión de la forma silvestre, en los segmentos de AER que se prolongan desde el endógeno, existe un porcentaje mayoritario de células que sobreexpresan nuestra construcción, no obstante algunas de las células pertenecientes a esta estructura ectópica no lo hacen. De manera parecida, no todas las células del AER aberrante en los ensayos de falta de función son GFP-positivas. Este dato apoya, indirectamente, nuestra hipótesis referente a la acción organizativa y de maduración de *Arid3b*; ya que, una célula genéticamente normal, podría adoptar cierta disposición anómala, si un porcentaje significativo de las células que la rodean se ven incapaces de madurar y organizarse correctamente. Por otra parte, se ha podido percibir que la disposición de las células tras la electroporación de la forma wt es diferente con respecto a la sobreexpresión tanto de las formas dominantes negativas como del control. En estos primordios las células del ectodermo electroporado, a menudo adquieren una distribución en forma de grumos o *clusters* mientras que en primordios electroporados con otras construcciones se disponen homogéneamente.

Aunque se han estudiado el patrón de expresión, tanto de moléculas de adhesión, como de polaridad en la cresta ectodérmica apical en los ensayos de ganancia y pérdida de función, se deben analizar un mayor número de marcadores de este tipo para determinar la posible función de *Arid3b* en estos procesos celulares. Por otro lado, aunque existen numerosas evidencias que sugieren que el pre-AER alcanza su localización y estructura final mediante un proceso de migración no se conoce con exactitud el procedimiento por el cual esto ocurre. Si esto fuera así, *Arid3b* podría estar controlando la capacidad migratoria de las células del AER. El estudio de eventos de migración e intercalación y de moléculas implicadas en procesos tales como el de convergencia y extensión que se produce durante la gastrulación podrían revelar nuevos datos en torno a la formación del AER. Asimismo debería estudiarse más en detalle la posibilidad de que la cresta ectodérmica apical fuese un epitelio polarizado. Procesos similares al de planar cell polarity implicado en la formación del oído podrían ser necesario para la maduración del AER. Moléculas responsables de este proceso deberían ser analizadas.

Para verificar esta hipótesis una alternativa es la realización de experimentos *in vitro* en líneas celulares que se asemejen lo más posible a la cresta ectodérmica apical.

## **9. Osificación en las extremidades del embrión de pollo y pato**

Los resultados obtenidos tras el estudio del patrón de osificación de la extremidad inferior del embrión de pollo han revelado que la secuencia de aparición de los centros de osificación discrepa del observado durante la formación de los elementos cartilagosos. Mientras que estos últimos se establecen en un sentido próximo-distal, primero las falanges proximales, posteriormente las mediales y por último las distales, el patrón de osificación no parece seguir dicha dinámica. Este patrón de osificación coincide totalmente con el publicado en estudios anteriores (Harman and A., 1938) con una pequeña salvedad. En los embriones analizados en nuestro laboratorio observamos que, con respecto a dicho estudio, las primeras falanges de los dígitos 2 y 3 osifican un día antes y la segunda falange del dedo 4 lo hace un día después. Resulta necesario indicar que aunque exista esta pequeña diferencia en el estadio en el que se detecta la osificación, el orden en el que se produce este fenómeno en cada una de las falanges de la pata se conserva absolutamente. Una posible explicación a este ligero desfase podría residir en las pequeñas divergencias, referentes al desarrollo del hueso, asociadas al sexo del embrión. Numerosos estudios han determinado que en el embrión de pollo, los elementos cartilagosos de las hembras osifican previamente a los de los machos (Harman and A., 1938). En la publicación citada, los embriones eran sexados y se escogió una misma proporción de machos y hembras en cada estadio analizado. Además el número de ejemplares analizados fue superior. En nuestros ensayos, no se llevó a cabo ningún tipo de sexado y la cantidad de especímenes estudiados resultó menor; por lo que existe cierta posibilidad de que aleatoriamente se hayan introducido un mayor o menor porcentaje de

hembras o machos. Esta desviación podría ser la causante de las ligeras variaciones observadas.

En cualquier caso, el patrón de osificación de la pata del pollo difiere en gran medida del descrito en mamíferos tales como el ratón, la rata o el ser humano, en los que la punta de todos los dedos precede al del resto de las falanges.

Podría existir una relación, aunque no estricta, entre el tamaño de la falange y el momento en el que sufre el proceso de osificación. De esta manera, falanges de un mayor tamaño osificarían previamente, seguidas por las de tamaño intermedio y finalmente las más reducidas.

Por otro lado, la tinción con Alcian blue y Alizarin red llevada a cabo tanto en embriones de pollo como de pato no han mostrado la presencia de centros de osificación secundarios en estas especies hasta los estadios estudiados. Estos centros de osificación, en la mayoría de los casos, se generan en etapas postnatales, por lo que resulta concebible que no se detecten durante la embriogénesis.

En los ensayos de osificación en el ala del embrión de pollo podemos indicar que el patrón de osificación en esta extremidad adopta una dinámica similar a la descrita en la pata, con la osificación de las falanges proximales y mediales precediendo a las distales. Sin embargo no podemos descartar que transcurra siguiendo el propio establecimiento condrogénico de las falanges o que pueda estar relacionada con su tamaño.

Curiosamente no se ha evidenciado ningún tipo de indicio de osificación en la punta del dedo 4 en las etapas embrionarias estudiadas. No obstante, la existencia de dicha falange en el individuo adulto, así como en los restos esqueléticos de ejemplares de esta especie parecen sugerir que la punta del dedo 4 se osifica en algún momento de la vida del individuo.

En la extremidad inferior del embrión de pato, a excepción del dedo 2, el resto de los dígitos exhiben un patrón de osificación comparable al descrito en algunos mamíferos, donde las puntas preceden a las falanges mediales (Harman and A., 1938; Kaufmann, 1992) mientras que el dedo 2 se osifica de igual manera que el pollo. En el ala, al igual que el pollo, la dinámica de osificación resultante sería compatible tanto con un patrón relacionado con el tamaño de las falanges como por una pauta que reproduce el proceso de condrogénesis.

## **10. La punta de los dedos en pollo y pato osifica de manera diferente al resto de las falanges**

Las últimas falanges pertenecientes a la extremidad inferior del pollo y del pato muestran un patrón de osificación diferente al resto. Estas falanges presentan un único centro de osificación en posición distal y una única placa de crecimiento contigua localizada en situación más proximal. Además, mientras que los centros de osificación en las falanges proximales y mediales se disponen con forma de anillo, en las puntas estos se inician con intensidad en posición ventral, posteriormente en posición dorsal y desde estas regiones se extienden

al resto de la falange. Esta diferencia, evidentemente, debe tener algún tipo de mecanismo molecular asociado, por lo que la existencia de un programa específico para la punta se ve apoyada. Además dicho programa debe activarse durante el establecimiento de la punta y mantenerse a lo largo de las posteriores etapas de formación como son la diferenciación o la formación de la uña o garra. Precisamente el posicionamiento de esta estructura epidérmica podría ser causa/efecto de la restricción ventral en las primeras etapas de la osificación de la última falange. Una posibilidad podría ser que la presencia de la uña en la región dorsal provocase que la osificación se inicie primeramente en posición ventral. Otra posibilidad es que la osificación iniciada en la parte ventral motivase la localización de la uña en posición dorsal. Estudios posteriores podrán aportar datos que apoyen una u otra hipótesis.

## **II. Bambi y Sp8 son marcadores de punta conservados en diferentes especies**

Ensayos anteriores y experimentos realizados en esta tesis doctoral han demostrado que *Sp8* y *Bambi* se expresan en la punta de los dedos de las extremidades pertenecientes a embriones de ratón, pollo y pato. Aunque estos genes se expresan en numerosas estructuras durante el desarrollo embrionario, (incluido el primordio de la extremidad) en los dígitos la única falange que muestra niveles detectables es la última. Por este motivo, una vez más, podemos sugerir la existencia de un programa genético especial que controla la formación de esta estructura.

*Bambi* se expresa en el mesénquima interdigital a lo largo de diferentes estadios embrionarios y responde a la señalización por BMPs tal y como se observa tras la aplicación de microesferas impregnadas de NOGGINA o BMPs (Zuzarte-Luis et al., 2004). A continuación, en el momento de inducción de la punta se activa en el mesénquima de la parte distal de la última falange, siguiendo una secuencia antero-posterior. Esta activación se produce tras la desaparición del AER en cada uno de los dígitos y corresponde al momento en el que el patrón próximo distal del dedo se ha determinado y finaliza la condrogénesis. Durante ese proceso se ha detectado un incremento en los niveles de moléculas pertenecientes a la cascada de señalización de las BMPs (Macías et al., 1997) por lo que la presencia de *Bambi* en esa región en ese determinado instante podría ser consecuencia la activación de esta vía. De manera similar podría explicarse la expresión de *Bambi* en etapas más tardías, esta vez en el ectodermo, recubriendo y restringiéndose a la totalidad de la última falange, ya que existen miembros de la vía de BMPs que se expresan en el mesénquima de la punta a esos estadios. No obstante no se ha demostrado tal interacción en ninguno de los casos.

Aparentemente la falta de función de *Bambi* durante el desarrollo embrionario del ratón no provoca ningún tipo de alteración evidente (Chen et al., 2007), lo que demuestra que no es imprescindible para la correcta formación del individuo ni esencial para el adecuado desarrollo de la extremidad murina. El patrón solapante de otros inhibidores de la vía de BMPs en algunas estructuras podría explicar esta ausencia de fenotipo mediante un fenómeno de

compensación. Con todo, no se conocen actualmente moléculas de dicha naturaleza que se expresen en la última falange.

*Sp8*, por su parte, se expresa en el AER durante el desarrollo embrionario de diferentes vertebrados tales como el ratón, el pollo o el pez cebra (Kawakami et al., 2004). Durante las primeras etapas en la inducción del primordio, *Sp8* se induce en el ectodermo de esta estructura mediante la activación de la vía de Wnts y su falta de función provoca truncaciones en el eje próximo-distal de la extremidad (Bell et al., 2003; Kawakami et al., 2004; Treichel et al., 2003). De manera equivalente a la descrita en el AER, la expresión de *Sp8* en la punta de los dedos en las etapas tardías aquí descritas, podría estar controlada por la vía de Wnts. La presencia de diferentes miembros de esta vía tales como WNT14, WNT5a o FRIZZLED4 (Chimal-Monroy et al., 2002; Sanz-Ezquerro and Tickle, 2003), en los primeros estadios de la formación de la última falange, podrían ser responsables de la regulación de *Sp8* en esta región.

El posible papel de *Sp8* asociado a la punta del dedo es actualmente desconocido. Los ensayos de falta de función tanto en el pollo como en el ratón provocan deficiencias relativamente tempranas en el crecimiento próximo-distal de la extremidad y el autopodio nunca se llega a formar. Abordajes condicionales en ratón, eliminando el gen a estadios posteriores, podrían revelar un rol de este factor de transcripción durante el desarrollo de la última falange.

## **12. El dedo 3 del ala del pollo es un dedo truncado que carece de punta**

Si se compara anatómicamente el dedo 3 del ala del embrión de pollo con el perteneciente al embrión de pato se observa que el primero presenta una falange menos. Además, parece fácil deducir que las dos primeras falanges de este dedo en ambas especies se mantienen, mientras que es la tercera falange del pato la que no puede ser apreciada en el ala del pollo. Curiosamente la punta del dedo 3 en el embrión de pato presenta una morfología similar a la del dedo 2 y, al igual que éste, muestra una garra vestigial. Ambas características no se reconocen en la última falange del mismo dedo en el ala del pollo. Asimismo, el patrón de osificación en ambas falanges resultó muy distinto, ya que en el pollo, esta estructura osifica de manera análoga a como lo hacen las falanges proximales y mediales y en el caso del pato lo hace de igual forma que una punta. Por otro lado, *Bambi*, marcador de punta, se expresa fuertemente en la última falange del dedo 3 del pato mientras que en el pollo no se detectaron niveles de estas moléculas. El conjunto de estos datos parece sugerir que la última falange del dedo 3 del ala del pollo no es, en realidad, una “verdadera punta” y que este dedo es un dígito truncado. Este hecho podría ser relevante en un contexto evolutivo tal y como se discute a continuación.

### **13. Aportación al origen monofilético del orden Galliformes y Anseriformes**

Actualmente la inmensa mayoría de los ornitólogos consideran que los órdenes Galliformes (gallo/gallina, codornices, perdices, faisanes...) y Anseriformes (patos, gansos, chuñas...) provienen de un único ancestro común y se encuentran en un nivel evolutivo similar. Aunque el origen monofilético de estas dos categorías está ampliamente aceptado, aún existe cierto grado de controversia al respecto. Los resultados provenientes de ensayos moleculares (Chubb, 2004) apoyan dicha hipótesis mientras que los estudios morfológicos no terminan de coincidir con esta teoría (Mayr and Clarke, 2003). En este sentido, algunos de los resultados de esta tesis doctoral podrían aportar nuevas evidencias a este respecto. Se ha observado una clara diferencia en el patrón de osificación entre la pata del embrión de pollo y pato así como la presencia de una falange menos en el dedo 3 del ala del embrión de pollo. Si observamos los elementos esqueléticos de aves evolutivamente anteriores y posteriores a los galliformes, podemos considerar que la pérdida de la última falange del dedo 3 es aceptado como un adelanto evolutivo. La ausencia de punta en el dedo 3 del ala del pollo apoyaría la posibilidad de que este orden pudiera tener un grado evolutivo superior al de los Anseriformes. No obstante aunque este hecho se suma a una lista muy extensa de datos que apoya esta posibilidad, existe otra lista igual de extensa que no lo hace.

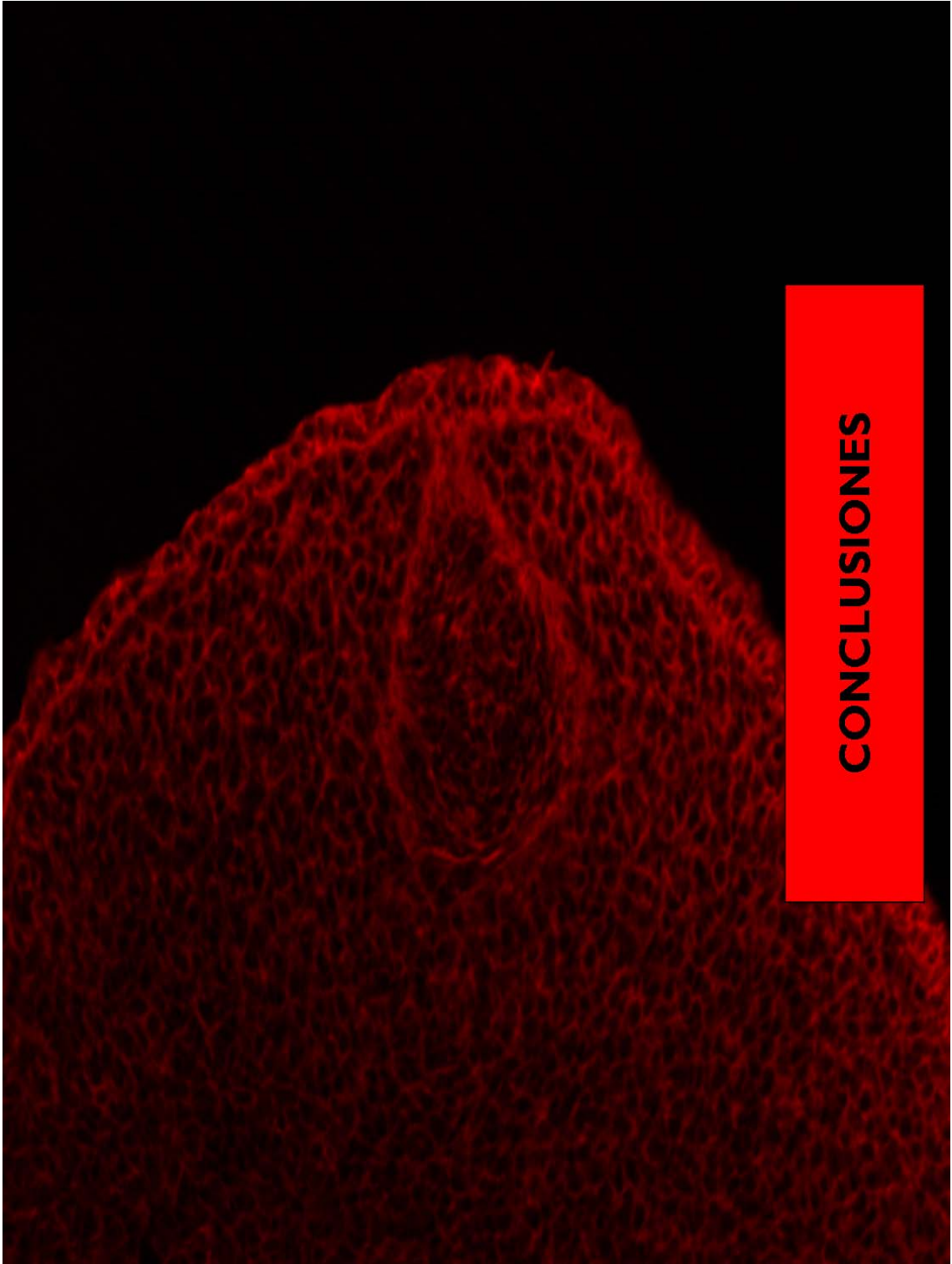
### **14. Experimentos de manipulación en primordios tardíos provocan cambios en la identidad molecular de los dedos**

Ensayos anteriores en el embrión de pollo han demostrado que manipulaciones en los interdógitos durante el desarrollo de los dedos provocan variaciones en el número de falanges así como en su morfología (Dahn and Fallon, 2000). Basándose en las características morfológicas y anatómicas de los dígitos manipulados, los responsables de dicho estudio interpretaron estas modificaciones como cambios en la identidad de los dedos. La utilización del número y forma de las falanges como único parámetro utilizado ha sido una de las carencias que se le han asignado a este trabajo. Sin embargo, la ausencia de marcadores genéticos diferenciales que otorguen una identidad a cada dedo, imposibilita la utilización de un criterio molecular.

El patrón de expresión de *Bambi* en la extremidad superior del embrión de pollo, restringido a la punta del dedo 2, nos ha permitido diferenciar molecularmente este dedo del resto que conforman el ala. Por este motivo se han realizado ensayos similares a los descritos por Dahn en el año 2000, en el ala del pollo, transformando el dedo 3 en 2. Empleando la sonda de *Bambi* se ha podido determinar que las modificaciones anatómicas observadas en los dedos manipulados, en un cierto número de casos, se corresponden con una activación de *Bambi*. Este hecho indicaría un cambio de identidad, no sólo a nivel anatómico, sino molecular. Aunque los niveles de expresión de *Bambi* en



estos dígitos modificados no son tan elevados como en el dedo 2, la presencia de este marcador, totalmente ausente en el dedo 3 control, indica un cambio de identidad, al menos parcial. Esto y el hecho de que la frecuencia en la que este fenómeno se produce no es muy alta, pensamos que puede ser debido a la dificultad técnica que entraña este tipo de transformaciones. Asimismo la ventana temporal en la que estas modificaciones son capaces de producir un efecto en la identidad de los dedos es muy reducida, y pequeñas variaciones en el estadio de los embriones empleados puede ser determinante. Por otro lado el porcentaje de tejido que va a contribuir al dedo modificado también parece determinante a la hora de alcanzar un resultado satisfactorio. En cualquier caso es de resaltar la importancia del resultado pues reflejaría la posibilidad de transformar la identidad de un dedo en otro, basándose en un marcador molecular y no únicamente en caracteres anatómicos de interpretación a veces subjetiva y difícil de cuantificar. En este sentido es la primera vez que se documenta una transformación de este tipo.

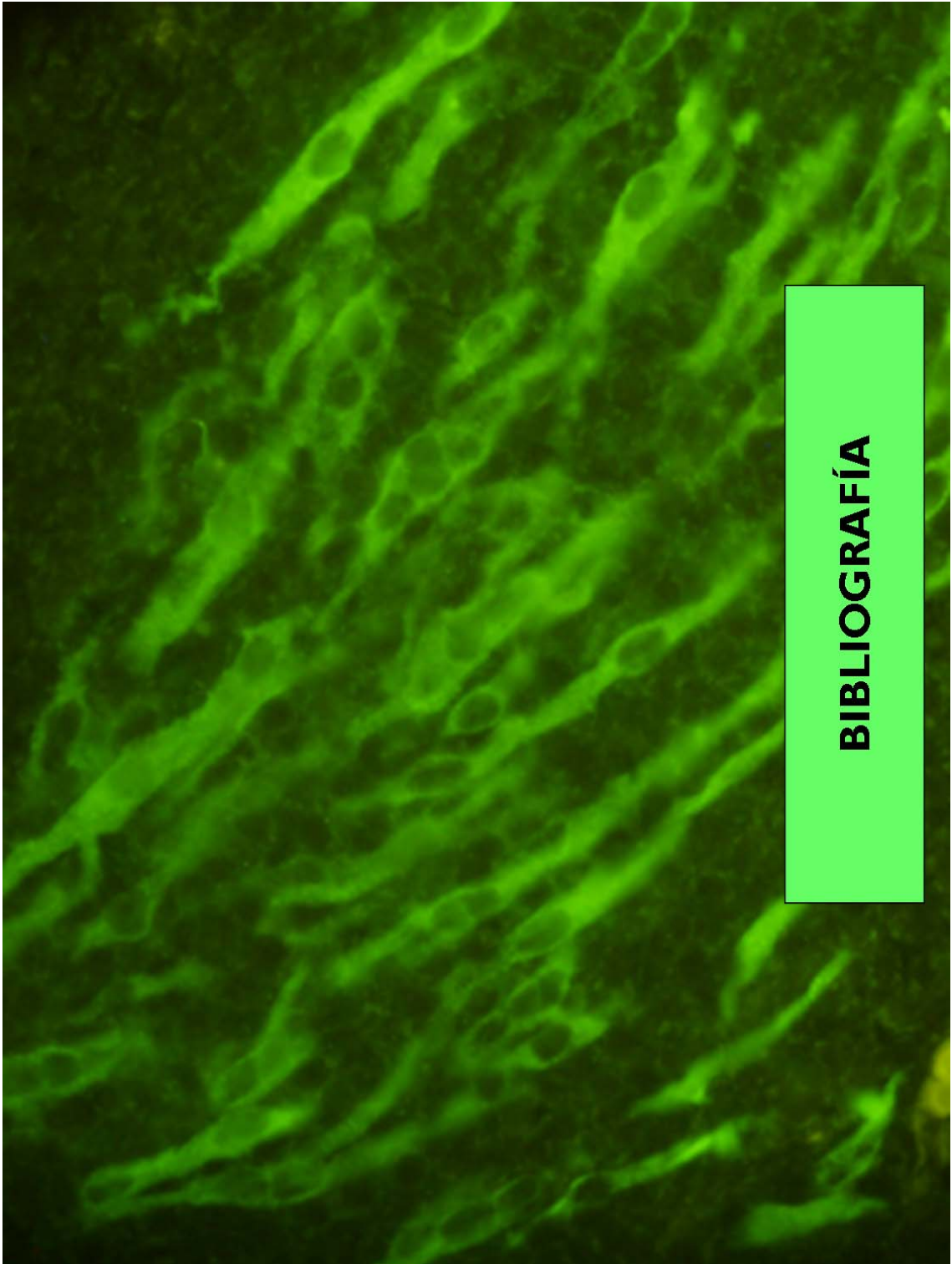




# CONCLUSIONES

1. *Arid3b* presenta un patrón de expresión dinámico y órgano-específico durante el desarrollo del embrión de pollo y de ratón. Este patrón se encuentra muy conservado entre estas especies e incluye la cresta ectodérmica apical (AER), estructura esencial para la correcta formación de la extremidad.
2. La secuencia del cDNA perteneciente al gen *Arid3b* en pollo se encuentra altamente conservada con respecto a sus homólogos en otras especies. El nivel de homología es especialmente alto en el dominio de unión a DNA.
3. Ensayos de ganancia y pérdida de función en el embrión de pollo, así como ensayos de falta de función en ratón, demuestran un papel esencial, conservado, de *Arid3b* durante la formación de la cresta ectodérmica apical (AER) en el desarrollo de la extremidad.
4. *Arid3b* no parece controlar el posicionamiento (mediado por el establecimiento de un correcto borde dorso-ventral), la inducción, o la homeostasis del AER. Sin embargo el análisis de diferentes marcadores celulares parecen indicar que *Arid3b* controla la morfogénesis, maduración, organización y estructuración de la cresta ectodérmica apical durante su establecimiento.
5. El patrón de expresión en el embrión de ratón y pollo, así como el fenotipo letal embrionario observado en los mutantes de falta de función de ratón indican un papel esencial de *Arid3b* durante numerosos procesos en la embriogénesis.
6. Los resultados del análisis del patrón de osificación en las extremidades del embrión de pollo han demostrado que la punta de los dedos no se osifica con anterioridad a las falanges proximales-mediales tal y como sucede en la mayor parte de los mamíferos. Por el contrario, ensayos similares revelaron que la última falange de la extremidad inferior en el embrión de pato osifica previamente a las falanges mediales.
7. *Bambi* y *Sp8* se reexpresan en el ectodermo de la punta de los dedos una vez que el patrón de expresión en la extremidad en etapas anteriores se ha extinguido. Este dato sugiere un papel relevante en la formación de esta estructura.
8. Estudios de la dinámica de osificación y del patrón de expresión de *Bambi* y *Sp8* en la extremidad superior de pollo y pato han demostrado que el dedo 3 del ala de pollo es un dígito truncado que carece de punta.
9. La obtención de nuevos marcadores de punta nos ha permitido diferenciar, inequívocamente, la última falange con respecto al resto. Esto ha sido empleado como herramienta para demostrar, molecularmente, cambios en la identidad de los dedos del ala del pollo.







# **BIBLIOGRAFÍA**

- Acampora, D., Merlo, G. R., Paleari, L., Zerega, B., Postiglione, M. P., Mantero, S., Bober, E., Barbieri, O., Simeone, A. and Levi, G.** (1999). Craniofacial, vestibular and bone defects in mice lacking the Distal-less-related gene *Dlx5*. *Development* **126**, 3795-809.
- Adamska, M., MacDonald, B. T. and Meisler, M. H.** (2003). Doubleridge, a mouse mutant with defective compaction of the apical ectodermal ridge and normal dorsal-ventral patterning of the limb. *Dev Biol* **255**, 350-62.
- Adamska, M., MacDonald, B. T., Sarmast, Z. H., Oliver, E. R. and Meisler, M. H.** (2004). *En1* and *Wnt7a* interact with *Dkk1* during limb development in the mouse. *Dev Biol* **272**, 134-44.
- Agarwal, P., Wylie, J. N., Galceran, J., Arkhitko, O., Li, C., Deng, C., Grosschedl, R. and Bruneau, B. G.** (2003). *Tbx5* is essential for forelimb bud initiation following patterning of the limb field in the mouse embryo. *Development* **130**, 623-33.
- Ahn, K., Mishina, Y., Hanks, M. C., Behringer, R. R. and Crenshaw, E. B., 3rd.** (2001). BMPR-IA signaling is required for the formation of the apical ectodermal ridge and dorsal-ventral patterning of the limb. *Development* **128**, 4449-61.
- Ahn, S. and Joyner, A. L.** (2004). Dynamic changes in the response of cells to positive hedgehog signaling during mouse limb patterning. *Cell* **118**, 505-16.
- Altabef, M., Clarke, J. D. and Tickle, C.** (1997). Dorso-ventral ectodermal compartments and origin of apical ectodermal ridge in developing chick limb. *Development* **124**, 4547-56.
- Ambler, C. A., Nowicki, J. L., Burke, A. C. and Bautch, V. L.** (2001). Assembly of trunk and limb blood vessels involves extensive migration and vasculogenesis of somite-derived angioblasts. *Dev Biol* **234**, 352-64.
- Archer, C. W., Douthwaite, G. P. and Francis-West, P.** (2003). Development of synovial joints. *Birth Defects Res C Embryo Today* **69**, 144-55.
- Arman, E., Haffner-Krausz, R., Gorivodsky, M. and Lonai, P.** (1999). *Fgfr2* is required for limb outgrowth and lung-branching morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11895-9.
- Arques, C. G., Doohan, R., Sharpe, J. and Torres, M.** (2007). Cell tracing reveals a dorsoventral lineage restriction plane in the mouse limb bud mesenchyme. *Development* **134**, 3713-22.
- Bandyopadhyay, A., Tsuji, K., Cox, K., Harfe, B. D., Rosen, V. and Tabin, C. J.** (2006). Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *PLoS Genet* **2**, e216.
- Barna, M. and Niswander, L.** (2007). Visualization of cartilage formation: insight into cellular properties of skeletal progenitors and chondrodysplasia syndromes. *Dev Cell* **12**, 931-41.
- Barrow, J. R., Thomas, K. R., Boussadia-Zahui, O., Moore, R., Kemler, R., Capecchi, M. R. and McMahon, A. P.** (2003). Ectodermal *Wnt3*/beta-catenin signaling is required for the establishment and maintenance of the apical ectodermal ridge. *Genes Dev* **17**, 394-409.
- Bastida, M. F. and Ros, M. A.** (2008). How do we get a perfect complement of digits? *Curr Opin Genet Dev* **18**, 374-80.



- Bell, S. M., Schreiner, C. M. and Scott, W. J.** (1998). The loss of ventral ectoderm identity correlates with the inability to form an AER in the legless hindlimb bud. *Mech Dev* **74**, 41-50.
- Bell, S. M., Schreiner, C. M., Waclaw, R. R., Campbell, K., Potter, S. S. and Scott, W. J.** (2003). Sp8 is crucial for limb outgrowth and neuropore closure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12195-200.
- Bi, W., Huang, W., Whitworth, D. J., Deng, J. M., Zhang, Z., Behringer, R. R. and de Crombrughe, B.** (2001). Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6698-703.
- Blaydon, D. C., Ishii, Y., O'Toole, E. A., Unsworth, H. C., Teh, M. T., Ruschendorf, F., Sinclair, C., Hopsu-Havu, V. K., Tidman, N., Moss, C. et al.** (2006). The gene encoding R-spondin 4 (RSPO4), a secreted protein implicated in Wnt signaling, is mutated in inherited anonychia. *Nat Genet* **38**, 1245-7.
- Borgens, R. B.** (1982). Mice regrow the tips of their foretoes. *Science* **217**, 747-50.
- Boulet, A. M., Moon, A. M., Arenkiel, B. R. and Capecchi, M. R.** (2004). The roles of Fgf4 and Fgf8 in limb bud initiation and outgrowth. *Dev Biol* **273**, 361-72.
- Brunet, L. J., McMahon, J. A., McMahon, A. P. and Harland, R. M.** (1998). Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science* **280**, 1455-7.
- Buck, A., Kispert, A. and Kohlhase, J.** (2001). Embryonic expression of the murine homologue of SALL1, the gene mutated in Townes--Brocks syndrome. *Mech Dev* **104**, 143-6.
- Buckland, R. A., Collinson, J. M., Graham, E., Davidson, D. R. and Hill, R. E.** (1998). Antagonistic effects of FGF4 on BMP induction of apoptosis and chondrogenesis in the chick limb bud. *Mech Dev* **71**, 143-50.
- Callery, E. M., Smith, J. C. and Thomsen, G. H.** (2005). The ARID domain protein drill1 is necessary for TGF(beta) signaling in Xenopus embryos. *Dev Biol* **278**, 542-59.
- Capdevila, J. and Belmonte, J. C.** (1999). Extracellular modulation of the Hedgehog, Wnt and TGF-beta signalling pathways during embryonic development. *Curr Opin Genet Dev* **9**, 427-33.
- Capdevila, J. and Izpisua Belmonte, J. C.** (2001). Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 87-132.
- Carrington, J. L. and Fallon, J. F.** (1986). Experimental manipulation leading to induction of dorsal ectodermal ridges on normal limb buds results in a phenocopy of the Eudiplopodia chick mutant. *Dev Biol* **116**, 130-7.
- Casanova, J. C. and Sanz-Ezquerro, J. J.** (2007). Digit morphogenesis: is the tip different? *Dev Growth Differ* **49**, 479-91.
- Cohn, M. J., Izpisua-Belmonte, J. C., Abud, H., Heath, J. K. and Tickle, C.** (1995). Fibroblast growth factors induce additional limb development from the flank of chick embryos. *Cell* **80**, 739-46.
- Colvin, J. S., Green, R. P., Schmahl, J., Capel, B. and Ornitz, D. M.** (2001a). Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. *Cell* **104**, 875-89.
- Colvin, J. S., White, A. C., Pratt, S. J. and Ornitz, D. M.** (2001b). Lung hypoplasia and neonatal death in Fgf9-null mice identify this gene as an essential regulator of lung mesenchyme. *Development* **128**, 2095-106.
- Critchlow, M. A. and Hinchliffe, J. R.** (1994). Immunolocalization of basement membrane components and beta 1 integrin in the chick wing bud identifies specialized properties of the apical ectodermal ridge. *Dev Biol* **163**, 253-69.

- Crossley, P. H. and Martin, G. R.** (1995). The mouse *Fgf8* gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development* **121**, 439-51.
- Crossley, P. H., Minowada, G., MacArthur, C. A. and Martin, G. R.** (1996). Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development. *Cell* **84**, 127-36.
- Curtiss and Heiling.** (1998). DeLIMiting development. *Bioessays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **20**, 58-69.
- Chen, H. and Johnson, R. L.** (1999). Dorsoventral patterning of the vertebrate limb: a process governed by multiple events. *Cell Tissue Res* **296**, 67-73.
- Chen, H., Lun, Y., Ovchinnikov, D., Kokubo, H., Oberg, K. C., Pepicelli, C. V., Gan, L., Lee, B. and Johnson, R. L.** (1998). Limb and kidney defects in *Lmx1b* mutant mice suggest an involvement of LMX1B in human nail patella syndrome. *Nat Genet* **19**, 51-5.
- Chen, J., Bush, J. O., Ovitt, C. E., Lan, Y. and Jiang, R.** (2007). The TGF-beta pseudoreceptor gene *Bambi* is dispensable for mouse embryonic development and postnatal survival. *Genesis* **45**, 482-6.
- Chevallier, A., Kieny, M. and Mauger, A.** (1977). Limb-somite relationship: origin of the limb musculature. *J Embryol Exp Morphol* **41**, 245-58.
- Chimal-Monroy, J., Montero, J. A., Ganan, Y., Macias, D., Garcia-Porrero, J. A. and Hurle, J. M.** (2002). Comparative analysis of the expression and regulation of *Wnt5a*, *Fz4*, and *Frzb1* during digit formation and in micromass cultures. *Dev Dyn* **224**, 314-20.
- Chimal-Monroy, J., Rodriguez-Leon, J., Montero, J. A., Ganan, Y., Macias, D., Merino, R. and Hurle, J. M.** (2003). Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: *Sox* genes and BMP signaling. *Dev Biol* **257**, 292-301.
- Christ, B., Jacob, H. J. and Jacob, M.** (1977). Experimental analysis of the origin of the wing musculature in avian embryos. *Anat Embryol (Berl)* **150**, 171-86.
- Chubb, A. L.** (2004). New nuclear evidence for the oldest divergence among neognath birds: the phylogenetic utility of ZENK (i). *Mol Phylogenet Evol* **30**, 140-51.
- Dahn, R. D. and Fallon, J. F.** (2000). Interdigital regulation of digit identity and homeotic transformation by modulated BMP signaling. *Science* **289**, 438-41.
- Davis, R. J., Shen, W., Heanue, T. A. and Mardon, G.** (1999). Mouse *Dach*, a homologue of *Drosophila dachshund*, is expressed in the developing retina, brain and limbs. *Dev Genes Evol* **209**, 526-36.
- Davis, R. J., Shen, W., Sandler, Y. I., Amoui, M., Purcell, P., Maas, R., Ou, C. N., Vogel, H., Beaudet, A. L. and Mardon, G.** (2001). *Dach1* mutant mice bear no gross abnormalities in eye, limb, and brain development and exhibit postnatal lethality. *Mol Cell Biol* **21**, 1484-90.
- Dealy, C. N., Scranton, V. and Cheng, H. C.** (1998). Roles of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor in chick limb development. *Dev Biol* **202**, 43-55.
- Ditch, L. M., Shirangi, T., Pitman, J. L., Latham, K. L., Finley, K. D., Edeen, P. T., Taylor, B. J. and McKeown, M.** (2005). *Drosophila* retained/dead ringer is necessary for neuronal pathfinding, female receptivity and repression of fruitless independent male courtship behaviors. *Development* **132**, 155-64.
- Dreyer, S. D., Morello, R., German, M. S., Zabel, B., Winterpacht, A., Lunstrum, G. P., Horton, W. A., Oberg, K. C. and Lee, B.** (2000). LMX1B transactivation and expression in nail-patella syndrome. *Hum Mol Genet* **9**, 1067-74.

- Dudley, A. T., Ros, M. A. and Tabin, C. J.** (2002). A re-examination of proximodistal patterning during vertebrate limb development. *Nature* **418**, 539-44.
- Eblaghie, M. C., Lunn, J. S., Dickinson, R. J., Munsterberg, A. E., Sanz-Ezquerro, J. J., Farrell, E. R., Mathers, J., Keyse, S. M., Storey, K. and Tickle, C.** (2003). Negative feedback regulation of FGF signaling levels by Pyst1/MKP3 in chick embryos. *Curr Biol* **13**, 1009-18.
- Engelkamp, D.** (2002). Cloning of three mouse Unc5 genes and their expression patterns at mid-gestation. *Mech Dev* **118**, 191-7.
- Fallon, J. F., Frederick, J. M., Carrington, J. L., Lanser, M. E. and Simandl, B. K.** (1983). Studies on a limbless mutant in the chick embryo. *Prog Clin Biol Res* **110 Pt A**, 33-43.
- Fallon, J. F. and Kelley, R. O.** (1977). Ultrastruct analysis of the apical ectodermal ridge during vertebrate limb morphogenesis. II. Gap junctions as distinctive ridge structures common to birds and mammals. *J Embryol Exp Morphol* **41**, 223-32.
- Fallon, J. F., Lopez, A., Ros, M. A., Savage, M. P., Olwin, B. B. and Simandl, B. K.** (1994). FGF-2: apical ectodermal ridge growth signal for chick limb development. *Science* **264**, 104-7.
- Feldman, B., Poueymirou, W., Papaioannou, V. E., DeChiara, T. M. and Goldfarb, M.** (1995). Requirement of FGF-4 for postimplantation mouse development. *Science* **267**, 246-9.
- Fernandez-Teran, M., Hinchliffe, J. R. and Ros, M. A.** (2006). Birth and death of cells in limb development: a mapping study. *Dev Dyn* **235**.
- Fernandez-Teran, M., Piedra, M. E., Simandl, B. K., Fallon, J. F. and Ros, M. A.** (1997). Limb initiation and development is normal in the absence of the mesonephros. *Dev Biol* **189**, 246-55.
- Fernandez-Teran, M. and Ros, M. A.** (2008). The Apical Ectodermal Ridge: morphological aspects and signaling pathways. *Int J Dev Biol* **52**, 857-71.
- Fisher, H.** (1940). The occurrence of vestigial claws on the wings of birds. *American Midland Naturalist* **23**, 234-243.
- Fleming, R. J., Gu, Y. and Hukriede, N. A.** (1997). Serrate-mediated activation of Notch is specifically blocked by the product of the gene fringe in the dorsal compartment of the Drosophila wing imaginal disc. *Development* **124**, 2973-81.
- Francis-West, P. H., Abdelfattah, A., Chen, P., Allen, C., Parish, J., Ladher, R., Allen, S., MacPherson, S., Luyten, F. P. and Archer, C. W.** (1999a). Mechanisms of GDF-5 action during skeletal development. *Development* **126**, 1305-15.
- Francis-West, P. H., Parish, J., Lee, K. and Archer, C. W.** (1999b). BMP/GDF-signalling interactions during synovial joint development. *Cell Tissue Res* **296**, 111-9.
- Francis, J. C., Radtke, F. and Logan, M. P.** (2005). Notch1 signals through Jagged2 to regulate apoptosis in the apical ectodermal ridge of the developing limb bud. *Dev Dyn* **234**, 1006-15.
- Fraser, R. A. and Abbott, U. K.** (1971). Studies on limb morphogenesis. V. The expression of Eudiplopodia and its experimental modification. *J Exp Zool* **176**, 219-36.
- Frobisch, N. B.** (2008). Ossification patterns in the tetrapod limb--conservation and divergence from morphogenetic events. *Biol Rev Camb Philos Soc* **83**, 571-600.
- Galceran, J., Farinas, I., Depew, M. J., Clevers, H. and Grosschedl, R.** (1999). Wnt3a-/- like phenotype and limb deficiency in Lef1(-/-)Tcf1(-/-) mice. *Genes Dev* **13**, 709-17.
- Ganan, Y., Macias, D., Basco, R. D., Merino, R. and Hurle, J. M.** (1998). Morphological diversity of the avian foot is related with the pattern of msx gene expression in the developing autopod. *Dev Biol* **196**, 33-41.

- Ganan, Y., Macias, D., Duterque-Coquillaud, M., Ros, M. A. and Hurle, J. M.** (1996). Role of TGF beta s and BMPs as signals controlling the position of the digits and the areas of interdigital cell death in the developing chick limb autopod. *Development* **122**, 2349-57.
- Gao, B., Guo, J., She, C., Shu, A., Yang, M., Tan, Z., Yang, X., Guo, S., Feng, G. and He, L.** (2001). Mutations in IHH, encoding Indian hedgehog, cause brachydactyly type A-1. *Nat Genet* **28**, 386-8.
- Gasseling, M. T. and Saunders, J. W., Jr.** (1961). Effects of the apical ectodermal ridge on growth of the versene-stripped chick limb bud. *Dev Biol* **3**, 1-25.
- Geduspan, J. S. and MacCabe, J. A.** (1989). Transfer of dorsoventral information from mesoderm to ectoderm at the onset of limb development. *Anat Rec* **224**, 79-87.
- Geduspan, J. S. and Solursh, M.** (1992). A growth-promoting influence from the mesonephros during limb outgrowth. *Dev Biol* **151**, 242-50.
- German, M. S., Wang, J., Fernald, A. A., Espinosa, R., 3rd, Le Beau, M. M. and Bell, G. I.** (1994). Localization of the genes encoding two transcription factors, LMX1 and CDX3, regulating insulin gene expression to human chromosomes 1 and 13. *Genomics* **24**, 403-4.
- Gilbert.** Developmental Biology 7th Ed, (ed. S. Associates). Sunderland (USA).
- Godwin, A. R. and Capecchi, M. R.** (1998). Hoxc13 mutant mice lack external hair. *Genes Dev* **12**, 11-20.
- Goel, S. C. and Jurand, A.** (1975). Electron microscopic studies on chick limb cartilage differentiated in tissue culture. *J Embryol Exp Morphol* **34**, 327-37.
- Gregory, S. L., Kortschak, R. D., Kalionis, B. and Saint, R.** (1996). Characterization of the dead ringer gene identifies a novel, highly conserved family of sequence-specific DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* **16**, 792-9.
- Grieshammer, Minowada, G., Pisenti, J., Abbott, U. and R., M. G.** (1996). The chick limbless mutation causes abnormalities in limb bud dorsal-ventral patterning: implications for the mechanism of apical ridge formation. *Development* **122**, 3851-3861.
- Grotewold, L., Plum, M., Dildrop, R., Peters, T. and Ruther, U.** (2001). Bambi is coexpressed with Bmp-4 during mouse embryogenesis. *Mech Dev* **100**, 327-30.
- Grotewold, L. and Ruther, U.** (2002). The Wnt antagonist Dickkopf-1 is regulated by Bmp signaling and c-Jun and modulates programmed cell death. *EMBO J* **21**, 966-75.
- Guo, Q., Loomis, C. and Joyner, A. L.** (2003). Fate map of mouse ventral limb ectoderm and the apical ectodermal ridge. *Dev Biol* **264**, 166-78.
- Hader, T., Wainwright, D., Shandala, T., Saint, R., Taubert, H., Bronner, G. and Jackle, H.** (2000). Receptor tyrosine kinase signaling regulates different modes of Groucho-dependent control of Dorsal. *Curr Biol* **10**, 51-4.
- Hamburger, V. and Hamilton, H. L.** (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. . *Journal of Morphology* **88**.
- Hammond, K. L., Hanson, I. M., Brown, A. G., Lettice, L. A. and Hill, R. E.** (1998). Mammalian and Drosophila dachshund genes are related to the Ski proto-oncogene and are expressed in eye and limb. *Mech Dev* **74**, 121-31.
- Han, M., Yang, X., Farrington, J. E. and Muneoka, K.** (2003). Digit regeneration is regulated by Msx1 and BMP4 in fetal mice. *Development* **130**, 5123-32.
- Han, M., Yang, X., Lee, J., Allan, C. H. and Muneoka, K.** (2008). Development and regeneration of the neonatal digit tip in mice. *Dev Biol* **315**, 125-35.
- Han, M., Yang, X., Taylor, G., Burdsal, C. A., Anderson, R. A. and Muneoka, K.** (2005). Limb regeneration in higher vertebrates: developing a roadmap. *Anat Rec B New Anat* **287**, 14-24.

- Harfe, B. D., Scherz, P. J., Nissim, S., Tian, H., McMahon, A. P. and Tabin, C. J.** (2004). Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. *Cell* **118**, 517-28.
- Harman and A., A.** (1938). Observations of the ossification of the foot-bones in Polydactyl and normal chicks. *The American Naturalist* **72**, 59-76.
- Hartmann, C. and Tabin, C. J.** (2001). Wnt-14 plays a pivotal role in inducing synovial joint formation in the developing appendicular skeleton. *Cell* **104**, 341-51.
- Hayamizu, T. F., Sessions, S. K., Wanek, N. and Bryant, S. V.** (1991). Effects of localized application of transforming growth factor beta 1 on developing chick limbs. *Dev Biol* **145**, 164-73.
- Healy, C., Uwanogho, D. and Sharpe, P. T.** (1999). Regulation and role of Sox9 in cartilage formation. *Dev Dyn* **215**, 69-78.
- Herrscher, R. F., Kaplan, M. H., Lelsz, D. L., Das, C., Scheuermann, R. and Tucker, P. W.** (1995). The immunoglobulin heavy-chain matrix-associating regions are bound by Bright: a B cell-specific trans-activator that describes a new DNA-binding protein family. *Genes Dev* **9**, 3067-82.
- Holder, N.** (1978). The onset of osteogenesis in the developing chick limb. *J Embryol Exp Morphol* **44**, 15-29.
- Hooper, J. E. and Scott, M. P.** (2005). Communicating with Hedgehogs. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 306-17.
- Iwahara, J. and Clubb, R. T.** (1999). Solution structure of the DNA binding domain from Dead ringer, a sequence-specific AT-rich interaction domain (ARID). *EMBO J* **18**, 6084-94.
- Iwahara, J., Iwahara, M., Daughdrill, G. W., Ford, J. and Clubb, R. T.** (2002). The structure of the Dead ringer-DNA complex reveals how AT-rich interaction domains (ARIDs) recognize DNA. *EMBO J* **21**, 1197-209.
- Jiang, R., Lan, Y., Chapman, H. D., Shawber, C., Norton, C. R., Serreze, D. V., Weinmaster, G. and Gridley, T.** (1998). Defects in limb, craniofacial, and thymic development in Jagged2 mutant mice. *Genes Dev* **12**, 1046-57.
- Johnson, E. B., Hammer, R. E. and Herz, J.** (2005). Abnormal development of the apical ectodermal ridge and polysyndactyly in Megf7-deficient mice. *Hum Mol Genet* **14**, 3523-38.
- Jurand, A.** (1965). Ultrastructural aspects of early development of the fore-limb buds in the chick and the mouse. *Proc R Soc B* **162**, 387-405.
- Kaltofen.** (1971). Embryonic development in the eggs of the Pekin Duck. In *Centre for Agricultural Publishing and Documentation*, (ed. Wageningen).
- Karsenty, G. and Wagner, E. F.** (2002). Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell* **2**, 389-406.
- Kaufmann.** (1992). The Atlas of mouse development, (ed. E. Ltd). London.
- Kawakami, Y., Capdevila, J., Buscher, D., Itoh, T., Rodriguez Esteban, C. and Izpisua Belmonte, J. C.** (2001). WNT signals control FGF-dependent limb initiation and AER induction in the chick embryo. *Cell* **104**, 891-900.
- Kawakami, Y., Esteban, C. R., Matsui, T., Rodriguez-Leon, J., Kato, S. and Belmonte, J. C.** (2004). Sp8 and Sp9, two closely related buttonhead-like transcription factors, regulate Fgf8 expression and limb outgrowth in vertebrate embryos. *Development* **131**, 4763-74.
- Kawakami, Y., Rodriguez-Leon, J., Koth, C. M., Buscher, D., Itoh, T., Raya, A., Ng, J. K., Esteban, C. R., Takahashi, S., Henrique, D. et al.** (2003). MKP3 mediates the cellular response to FGF8 signalling in the vertebrate limb. *Nat Cell Biol* **5**, 513-9.

- Kelley, R. O. and Fallon, J. F.** (1976). Ultrastructural analysis of the apical ectodermal ridge during vertebrate limb morphogenesis. 1. the human forelimb with special reference to gap junctions. *Dev Biol* **51**, 241-56.
- Kengaku, M., Capdevila, J., Rodriguez-Esteban, C., De La Pena, J., Johnson, R. L., Belmonte, J. C. and Tabin, C. J.** (1998). Distinct WNT pathways regulating AER formation and dorsoventral polarity in the chick limb bud. *Science* **280**, 1274-7.
- Kida, Y., Maeda, Y., Shiraishi, T., Suzuki, T. and Ogura, T.** (2004). Chick Dach1 interacts with the Smad complex and Sin3a to control AER formation and limb development along the proximodistal axis. *Development* **131**, 4179-87.
- Kieny, M.** (1970). [Part of somitic mesoderm in the differentiation of chick embryo limb]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* **270**, 2009-11.
- Kieny, M. and Dhouailly, D.** (1969). [Mechanisms of induction of a supplementary member in birds]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* **269**, 481-3.
- Kim, D., Probst, L., Das, C. and Tucker, P. W.** (2007). REKLES is an ARID3-restricted multifunctional domain. *J Biol Chem* **282**, 15768-77.
- Kim, D. and Tucker, P. W.** (2006). A regulated nucleocytoplasmic shuttle contributes to Bright's function as a transcriptional activator of immunoglobulin genes. *Mol Cell Biol* **26**, 2187-201.
- Kimmel, R. A., Turnbull, D. H., Blanquet, V., Wurst, W., Loomis, C. A. and Joyner, A. L.** (2000). Two lineage boundaries coordinate vertebrate apical ectodermal ridge formation. *Genes Dev* **14**, 1377-89.
- Kobayashi, K., Era, T., Takebe, A., Jakt, L. M. and Nishikawa, S.** (2006). ARID3B induces malignant transformation of mouse embryonic fibroblasts and is strongly associated with malignant neuroblastoma. *Cancer Res* **66**, 8331-6.
- Kortschak, R. D., Reimann, H., Zimmer, M., Eyre, H. J., Saint, R. and Jenne, D. E.** (1998). The human dead ringer/bright homolog, DRIL1: cDNA cloning, gene structure, and mapping to D19S886, a marker on 19p13.3 that is strictly linked to the Peutz-Jeghers syndrome. *Genomics* **51**, 288-92.
- Kortschak, R. D., Tucker, P. W. and Saint, R.** (2000). ARID proteins come in from the desert. *Trends Biochem Sci* **25**, 294-9.
- Kraus, P., Fraidenraich, D. and Loomis, C. A.** (2001). Some distal limb structures develop in mice lacking Sonic hedgehog signaling. *Mech Dev* **100**, 45-58.
- Kronenberg, H. M.** (2003). Developmental regulation of the growth plate. *Nature* **423**, 332-6.
- Kuhlman, J. and Niswander, L.** (1997). Limb deformity proteins: role in mesodermal induction of the apical ectodermal ridge. *Development* **35**, 421-430.
- Kulyk, W. M., Rodgers, B. J., Greer, K. and Kosher, R. A.** (1989). Promotion of embryonic chick limb cartilage differentiation by transforming growth factor-beta. *Dev Biol* **135**, 424-30.
- Lallemand, Y., Nicola, M. A., Ramos, C., Bach, A., Cloment, C. S. and Robert, B.** (2005). Analysis of Msx1; Msx2 double mutants reveals multiple roles for Msx genes in limb development. *Development* **132**, 3003-14.
- Lanctot, C., Moreau, A., Chamberland, M., Tremblay, M. L. and Drouin, J.** (1999). Hindlimb patterning and mandible development require the Ptx1 gene. *Development* **126**, 1805-10.
- Laufer, E., Dahn, R., Orozco, O. E., Yeo, C. Y., Pisenti, J., Henrique, D., Abbott, U. K., Fallon, J. F. and Tabin, C.** (1997). Expression of Radical fringe in limb-bud ectoderm regulates apical ectodermal ridge formation. *Nature* **386**, 366-73.

- Laufer, E., Nelson, C. E., Johnson, R. L., Morgan, B. A. and Tabin, C.** (1994). Sonic hedgehog and Fgf-4 act through a signaling cascade and feedback loop to integrate growth and patterning of the developing limb bud. *Cell* **79**, 993-1003.
- Lewandoski, M., Sun, X. and Martin, G. R.** (2000). Fgf8 signalling from the AER is essential for normal limb development. *Nat Genet* **26**, 460-3.
- Lewis, J. H.** (1975). Fate maps and the pattern of cell division: a calculation for the chick wing-bud. *J Embryol Exp Morphol* **33**, 419-34.
- Logan, C., Hornbruch, A., Campbell, I. and Lumsden, A.** (1997). The role of Engrailed in establishing the dorsoventral axis of the chick limb. *Development* **124**, 2317-24.
- Logan, M.** (2003). Finger or toe: the molecular basis of limb identity. *Development* **130**, 6401-10.
- Logan, M. and Tabin, C. J.** (1999). Role of Pitx1 upstream of Tbx4 in specification of hindlimb identity. *Science* **283**, 1736-9.
- Loomis, C. A., Harris, E., Michaud, J., Wurst, W., Hanks, M. and Joyner, A. L.** (1996). The mouse Engrailed-1 gene and ventral limb patterning. *Nature* **382**, 360-3.
- Loomis, C. A., Kimmel, R. A., Tong, C. X., Michaud, J. and Joyner, A. L.** (1998). Analysis of the genetic pathway leading to formation of ectopic apical ectodermal ridges in mouse Engrailed-1 mutant limbs. *Development* **125**, 1137-48.
- Lu, P., Yu, Y., Perdue, Y. and Werb, Z.** (2008). The apical ectodermal ridge is a timer for generating distal limb progenitors. *Development* **135**, 1395-405.
- MacDonald, B. T., Adamska, M. and Meisler, M. H.** (2004). Hypomorphic expression of Dkk1 in the doubleridge mouse: dose dependence and compensatory interactions with Lrp6. *Development* **131**, 2543-52.
- Macias, D., Ganan, Y., Ros, M. A. and Hurle, J. M.** (1996). In vivo inhibition of programmed cell death by local administration of FGF-2 and FGF-4 in the interdigital areas of the embryonic chick leg bud. *Anat Embryol (Berl)* **193**, 533-41.
- Macias, D., Ganan, Y., Sampath, T. K., Piedra, M. E., Ros, M. A. and Hurle, J. M.** (1997). Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. *Development* **124**, 1109-17.
- Makarenkova, H. and Patel, K.** (1999). Gap junction signalling mediated through connexin-43 is required for chick limb development. *Dev Biol* **207**, 380-92.
- Mao, B., Wu, W., Li, Y., Hoppe, D., Stannek, P., Glinka, A. and Niehrs, C.** (2001). LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* **411**, 321-5.
- Mardon, G., Solomon, N. M. and Rubin, G. M.** (1994). dachshund encodes a nuclear protein required for normal eye and leg development in Drosophila. *Development* **120**, 3473-86.
- Mariani, F. V., Ahn, C. P. and Martin, G. R.** (2008). Genetic evidence that FGFs have an instructive role in limb proximal-distal patterning. *Nature* **453**, 401-5.
- Mayr, G. and Clarke, J.** (2003). The deep divergences of neornithine birds: a phylogenetic analysis of morphological characters. *Cladistics* **19**, 527-553.
- McGlinn, E. and Tabin, C. J.** (2006). Mechanistic insight into how Shh patterns the vertebrate limb. *Curr Opin Genet Dev* **16**, 426-32.
- Mercader, N., Leonardo, E., Piedra, M. E., Martinez, A. C., Ros, M. A. and Torres, M.** (2000). Opposing RA and FGF signals control proximodistal vertebrate limb development through regulation of Meis genes. *Development* **127**, 3961-70.
- Merino, R., Ganan, Y., Macias, D., Economides, A. N., Sampath, K. T. and Hurle, J. M.** (1998). Morphogenesis of digits in the avian limb is controlled by FGFs, TGFbetas, and noggin through BMP signaling. *Dev Biol* **200**, 35-45.

- Merino, R., Macias, D., Ganan, Y., Rodriguez-Leon, J., Economides, A. N., Rodriguez-Esteban, C., Izpisua-Belmonte, J. C. and Hurle, J. M.** (1999a). Control of digit formation by activin signalling. *Development* **126**, 2161-70.
- Merino, R., Rodriguez-Leon, J., Macias, D., Ganan, Y., Economides, A. N. and Hurle, J. M.** (1999b). The BMP antagonist Gremlin regulates outgrowth, chondrogenesis and programmed cell death in the developing limb. *Development* **126**, 5515-22.
- Micchelli, C. A., Rulifson, E. J. and Blair, S. S.** (1997). The function and regulation of cut expression on the wing margin of *Drosophila*: Notch, Wingless and a dominant negative role for Delta and Serrate. *Development* **124**, 1485-95.
- Michaud, J. L., Lapointe, F. and Le Douarin, N. M.** (1997). The dorsoventral polarity of the presumptive limb is determined by signals produced by the somites and by the lateral somatopleure. *Development* **124**, 1453-63.
- Miettinen, P. J., Berger, J. E., Meneses, J., Phung, Y., Pedersen, R. A., Werb, Z. and Derynck, R.** (1995). Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature* **376**, 337-41.
- Milaire, J.** (1974). [La morphogenese des membres]. *Bull Acad R Med Belg* **129**, 341-61.
- Millan, F. A., Denhez, F., Kondaiah, P. and Akhurst, R. J.** (1991). Embryonic gene expression patterns of TGF beta 1, beta 2 and beta 3 suggest different developmental functions in vivo. *Development* **111**, 131-43.
- Min, H., Danilenko, D. M., Scully, S. A., Bolon, B., Ring, B. D., Tarpley, J. E., DeRose, M. and Simonet, W. S.** (1998). Fgf-10 is required for both limb and lung development and exhibits striking functional similarity to *Drosophila* branchless. *Genes Dev* **12**, 3156-61.
- Minguillon, C., Del Buono, J. and Logan, M. P.** (2005). Tbx5 and Tbx4 are not sufficient to determine limb-specific morphologies but have common roles in initiating limb outgrowth. *Dev Cell* **8**, 75-84.
- Momose, T., Tonegawa, A., Takeuchi, J., Ogawa, H., Umesono, K. and Yasuda, K.** (1999). Efficient targeting of gene expression in chick embryos by microelectroporation. *Dev Growth Differ* **41**, 335-44.
- Montero, J. A., Ganan, Y., Macias, D., Rodriguez-Leon, J., Sanz-Ezquerro, J. J., Merino, R., Chimal-Monroy, J., Nieto, M. A. and Hurle, J. M.** (2001). Role of FGFs in the control of programmed cell death during limb development. *Development* **128**, 2075-84.
- Montero, J. A., Lorda-Diez, C. I., Ganan, Y., Macias, D. and Hurle, J. M.** (2008). Activin/TGFbeta and BMP crosstalk determines digit chondrogenesis. *Dev Biol* **321**, 343-56.
- Moon, A. M., Boulet, A. M. and Capecchi, M. R.** (2000). Normal limb development in conditional mutants of Fgf4. *Development* **127**, 989-96.
- Moon, A. M. and Capecchi, M. R.** (2000). Fgf8 is required for outgrowth and patterning of the limbs. *Nat Genet* **26**, 455-9.
- Moran, J. L., Levorse, J. M. and Vogt, T. F.** (1999). Limbs move beyond the radical fringe. *Nature* **399**, 742-3.
- Morata, G.** (2001). How *Drosophila* appendages develop. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 89-97.
- Mukhopadhyay, M., Shtrom, S., Rodriguez-Esteban, C., Chen, L., Tsukui, T., Gomer, L., Dorward, D. W., Glinka, A., Grinberg, A., Huang, S. P. et al.** (2001). Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Dev Cell* **1**, 423-34.



- Muller, T. L., Ngo-Muller, V., Reginelli, A., Taylor, G., Anderson, R. and Muneoka, K.** (1999). Regeneration in higher vertebrates: limb buds and digit tips. *Semin Cell Dev Biol* **10**, 405-13.
- Musil, L. S. and Goodenough, D. A.** (1990). Gap junctional intercellular communication and the regulation of connexin expression and function. *Curr Opin Cell Biol* **2**, 875-80.
- Nam, J. S., Turcotte, T. J. and Yoon, J. K.** (2007). Dynamic expression of R-spondin family genes in mouse development. *Gene Expr Patterns* **7**, 306-12.
- Neumann, C. J. and Cohen, S. M.** (1996). A hierarchy of cross-regulation involving Notch, wingless, vestigial and cut organizes the dorsal/ventral axis of the *Drosophila* wing. *Development* **122**, 3477-85.
- Nieto, M. A., Patel, K. and Wilkinson, D. G.** (1996). In situ hybridization analysis of chick embryos in whole mount and tissue sections. *Methods Cell Biol* **51**, 219-235.
- Nishinakamura, R., Matsumoto, Y., Nakao, K., Nakamura, K., Sato, A., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Scully, S., Lacey, D. L. et al.** (2001). Murine homolog of SALL1 is essential for ureteric bud invasion in kidney development. *Development* **128**, 3105-15.
- Niswander, L.** (2003). Pattern formation: old models out on a limb. *Nat Rev Genet* **4**, 133-43.
- Niswander, L., Jeffrey, S., Martin, G. R. and Tickle, C.** (1994). A positive feedback loop coordinates growth and patterning in the vertebrate limb. *Nature* **371**, 609-12.
- Niswander, L., Tickle, C., Vogel, A., Booth, I. and Martin, G. R.** (1993). FGF-4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb. *Cell* **75**, 579-87.
- Nixon, J. C., Rajaiya, J. and Webb, C. F.** (2004). Mutations in the DNA-binding domain of the transcription factor Bright act as dominant negative proteins and interfere with immunoglobulin transactivation. *J Biol Chem* **279**, 52465-72.
- Noramly, S., Pisenti, J., Abbott, U. and Morgan, B.** (1996). Gene expression in the limbless mutant: polarized gene expression in the absence of Shh and an AER. *Dev Biol* **179**, 339-46.
- Numata, S., Claudio, P. P., Dean, C., Giordano, A. and Croce, C. M.** (1999). Bdp, a new member of a family of DNA-binding proteins, associates with the retinoblastoma gene product. *Cancer Res* **59**, 3741-7.
- Nye, H. L., Cameron, J. A., Chernoff, E. A. and Stocum, D. L.** (2003). Regeneration of the urodele limb: a review. *Dev Dyn* **226**, 280-94.
- Ohuchi, H., Nakagawa, T., Yamamoto, A., Araga, A., Ohata, T., Ishimaru, Y., Yoshioka, H., Kuwana, T., Nohno, T., Yamasaki, M. et al.** (1997). The mesenchymal factor, FGF10, initiates and maintains the outgrowth of the chick limb bud through interaction with FGF8, an apical ectodermal factor. *Development* **124**, 2235-44.
- Ohuchi, H., Yoshioka, H. and Noji, S.** (1995). [Induction of an additional limb by FGF and duplication of digits by Sonic hedgehog]. *Seikagaku* **67**, 1232-6.
- Omi, M., Fisher, M., Maihle, N. J. and Dealy, C. N.** (2005). Studies on epidermal growth factor receptor signaling in vertebrate limb patterning. *Dev Dyn* **233**, 288-300.
- Onichtchouk, D., Chen, Y. G., Dosch, R., Gawantka, V., Delius, H., Massague, J. and Niehrs, C.** (1999). Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* **401**, 480-5.
- Ornitz, D. M., Xu, J., Colvin, J. S., McEwen, D. G., MacArthur, C. A., Coulier, F., Gao, G. and Goldfarb, M.** (1996). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* **271**, 15292-7.

- Ott, H., Parrish, M., Bond, K., Schwaeger-Nickolenko, A. and Monaghan, A. P.** (2001). A new member of the spalt like zinc finger protein family, Msal-3, is expressed in the CNS and sites of epithelial/mesenchymal interaction. *Mech Dev* **101**, 203-207.
- Pajni-Underwood, S., Wilson, C. P., Elder, C., Mishina, Y. and Lewandoski, M.** (2007). BMP signals control limb bud interdigital programmed cell death by regulating FGF signaling. *Development* **134**, 2359-68.
- Pan, Y., Liu, Z., Shen, J. and Kopan, R.** (2005). Notch1 and 2 cooperate in limb ectoderm to receive an early Jagged2 signal regulating interdigital apoptosis. *Dev Biol* **286**, 472-82.
- Panin, V. M., Papayannopoulos, V., Wilson, R. and Irvine, K. D.** (1997). Fringe modulates Notch-ligand interactions. *Nature* **387**, 908-12.
- Parr, B. A. and McMahon, A. P.** (1995). Dorsalizing signal Wnt-7a required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb. *Nature* **374**, 350-3.
- Patsialou, A., Wilsker, D. and Moran, E.** (2005). DNA-binding properties of ARID family proteins. *Nucleic Acids Res* **33**, 66-80.
- Pautou, M. P.** (1978). Cessation of activity of the apical ectodermic crest during morphogenesis of the acropod in the chick embryo. Histological analysis. *Arch Biol (Liege)* **89**, 27-66.
- Pearse, R. V., 2nd, Scherz, P. J., Campbell, J. K. and Tabin, C. J.** (2007). A cellular lineage analysis of the chick limb bud. *Dev Biol* **310**, 388-400.
- Perantoni, A. O., Timofeeva, O., Naillat, F., Richman, C., Pajni-Underwood, S., Wilson, C., Vainio, S., Dove, L. F. and Lewandoski, M.** (2005). Inactivation of FGF8 in early mesoderm reveals an essential role in kidney development. *Development* **132**, 3859-71.
- Pinot, M.** (1970). [Relations between somite mesenchyma and lateral plate in early organogenesis of limbs in chickens]. *Annee Biol* **9**, 277-84.
- Pizette, S., Abate-Shen, C. and Niswander, L.** (2001). BMP controls proximodistal outgrowth, via induction of the apical ectodermal ridge, and dorsoventral patterning in the vertebrate limb. *Development* **128**, 4463-74.
- Pizette, S. and Niswander, L.** (1999). BMPs negatively regulate structure and function of the limb apical ectodermal ridge. *Development* **126**, 883-94.
- Pizette, S. and Niswander, L.** (2000). BMPs are required at two steps of limb chondrogenesis: formation of prechondrogenic condensations and their differentiation into chondrocytes. *Dev Biol* **219**, 237-49.
- Placzek, M. and Briscoe, J.** (2005). The floor plate: multiple cells, multiple signals. *Nat Rev Neurosci* **6**, 230-40.
- Polinkovsky, A., Robin, N. H., Thomas, J. T., Irons, M., Lynn, A., Goodman, F. R., Reardon, W., Kant, S. G., Brunner, H. G., van der Burgt, I. et al.** (1997). Mutations in CDMP1 cause autosomal dominant brachydactyly type C. *Nat Genet* **17**, 18-9.
- Rajaiya, J., Nixon, J. C., Ayers, N., Desgranges, Z. P., Roy, A. L. and Webb, C. F.** (2006). Induction of immunoglobulin heavy-chain transcription through the transcription factor Bright requires TFII-I. *Mol Cell Biol* **26**, 4758-68.
- Rallis, C., Bruneau, B. G., Del Buono, J., Seidman, C. E., Seidman, J. G., Nissim, S., Tabin, C. J. and Logan, M. P.** (2003). Tbx5 is required for forelimb bud formation and continued outgrowth. *Development* **130**, 2741-51.
- Riddle, R. D., Ensini, M., Nelson, C., Tsuchida, T., Jessell, T. M. and Tabin, C.** (1995). Induction of the LIM homeobox gene Lmx1 by WNT7a establishes dorsoventral pattern in the vertebrate limb. *Cell* **83**, 631-40.
- Riddle, R. D., Johnson, R. L., Laufer, E. and Tabin, C.** (1993). Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* **75**, 1401-16.

- Roark, E. F. and Greer, K.** (1994). Transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein-2 act by distinct mechanisms to promote chick limb cartilage differentiation in vitro. *Dev Dyn* **200**, 103-16.
- Rodriguez-Esteban, C., Schwabe, J. W., De La Pena, J., Foy, B., Eshelman, B. and Belmonte, J. C.** (1997). Radical fringe positions the apical ectodermal ridge at the dorsoventral boundary of the vertebrate limb. *Nature* **386**, 360-6.
- Rodriguez-Esteban, C., Tsukui, T., Yonei, S., Magallon, J., Tamura, K. and Izpisua Belmonte, J. C.** (1999). The T-box genes Tbx4 and Tbx5 regulate limb outgrowth and identity. *Nature* **398**, 814-8.
- Ros, M. A., Lopez-Martinez, A., Simandl, B. K., Rodriguez, C., Izpisua Belmonte, J. C., Dahn, R. and Fallon, J. F.** (1996). The limb field mesoderm determines initial limb bud anteroposterior asymmetry and budding independent of sonic hedgehog or apical ectodermal gene expressions. *Development* **122**, 2319-30.
- Rowe, D. A., Cairns, J. M. and Fallon, J. F.** (1982). Spatial and temporal patterns of cell death in limb bud mesoderm after apical ectodermal ridge removal. *Dev Biol* **93**, 83-91.
- Rubin, L. and Saunders, J. W., Jr.** (1972). Ectodermal-mesodermal interactions in the growth of limb buds in the chick embryo: constancy and temporal limits of the ectodermal induction. *Dev Biol* **28**, 94-112.
- Sanz-Ezquerro, J. J. and Tickle, C.** (2000). Autoregulation of Shh expression and Shh induction of cell death suggest a mechanism for modulating polarising activity during chick limb development. *Development* **127**, 4811-23.
- Sanz-Ezquerro, J. J. and Tickle, C.** (2003). Fgf signaling controls the number of phalanges and tip formation in developing digits. *Curr Biol* **13**, 1830-6.
- Sato, K., Koizumi, Y., Takahashi, M., Kuroiwa, A. and Tamura, K.** (2007). Specification of cell fate along the proximal-distal axis in the developing chick limb bud. *Development* **134**, 1397-406.
- Saunders JW, J., Gasseling MT.** (1968). Ectoderm-mesenchymal interactions in the origin of wing symmetry. In *Epithelial-Mesenchymal Interactions* (ed. F. Billingham RE and R. W. a. Wilkins).
- Saunders, J. W., Jr.** (1948). The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. *J Exp Zool* **108**, 363-403.
- Scherz, P. J., Harfe, B. D., McMahon, A. P. and Tabin, C. J.** (2004). The limb bud Shh-Fgf feedback loop is terminated by expansion of former ZPA cells. *Science* **305**, 396-9.
- Schofield, J. N. and Wolpert, L.** (1990). Effect of TGF-beta 1, TGF-beta 2, and bFGF on chick cartilage and muscle cell differentiation. *Exp Cell Res* **191**, 144-8.
- Schupbach, T. and Wieschaus, E.** (1991). Female sterile mutations on the second chromosome of *Drosophila melanogaster*. II. Mutations blocking oogenesis or altering egg morphology. *Genetics* **129**, 1119-36.
- Searls, R. L. and Janners, M. Y.** (1971). The initiation of limb bud outgrowth in the embryonic chick. *Dev Biol* **24**, 198-213.
- Sekine, K., Ohuchi, H., Fujiwara, M., Yamasaki, M., Yoshizawa, T., Sato, T., Yagishita, N., Matsui, D., Koga, Y., Itoh, N. et al.** (1999). Fgf10 is essential for limb and lung formation. *Nat Genet* **21**, 138-41.
- Sekiya, T., Adachi, S., Kohu, K., Yamada, T., Higuchi, O., Furukawa, Y., Nakamura, Y., Nakamura, T., Tashiro, K., Kuhara, S. et al.** (2004). Identification of BMP and activin membrane-bound inhibitor (BAMBI), an inhibitor of transforming

growth factor-beta signaling, as a target of the beta-catenin pathway in colorectal tumor cells. *J Biol Chem* **279**, 6840-6.

**Shandala, T., Kortschak, R. D., Gregory, S. and Saint, R.** (1999). The *Drosophila* dead ringer gene is required for early embryonic patterning through regulation of *argos* and *buttonhead* expression. *Development* **126**, 4341-9.

**Shandala, T., Kortschak, R. D. and Saint, R.** (2002). The *Drosophila* retained/dead ringer gene and ARID gene family function during development. *Int J Dev Biol* **46**, 423-30.

**Sharpe, J.** (2002). 12 New approaches for studying limb development: optical projection tomography and computer modelling. *J Anat* **201**, 420.

**Sharpe, J., Ahlgren, U., Perry, P., Hill, B., Ross, A., Hecksher-Sorensen, J., Baldock, R. and Davidson, D.** (2002). Optical projection tomography as a tool for 3D microscopy and gene expression studies. *Science* **296**, 541-5.

**Shubin, N. H. A., P.** (1986). A morphogenetic approach to the origin and basic organization of the tetrapod limb. In *Evolutionary Biology*, vol. 20 (ed. M. K. W. B. H. & G. T. Prance), pp. 319-387. New York.

**Sibilia, M. and Wagner, E. F.** (1995). Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science* **269**, 234-8.

**Sidow, A., Bulotsky, M. S., Kerrebrock, A. W., Bronson, R. T., Daly, M. J., Reeve, M. P., Hawkins, T. L., Birren, B. W., Jaenisch, R. and Lander, E. S.** (1997). *Serrate2* is disrupted in the mouse limb-development mutant syndactylism. *Nature* **389**, 722-5.

**Soshnikova, N., Zechner, D., Huelsken, J., Mishina, Y., Behringer, R. R., Taketo, M. M., Crenshaw, E. B., 3rd and Birchmeier, W.** (2003). Genetic interaction between Wnt/beta-catenin and BMP receptor signaling during formation of the AER and the dorsal-ventral axis in the limb. *Genes Dev* **17**, 1963-8.

**Stephens, T. D., Baker, W. C., Cotterell, J. W., Edwards, D. R., Pugmire, D. S., Roberts, S. G., Shaker, M. R., Willis, H. J. and Winger, K. P.** (1993). Evaluation of the chick wing territory as an equipotential self-differentiating system. *Dev Dyn* **197**, 157-68.

**Stephens, T. D. and McNulty, T. R.** (1981). Evidence for a metameric pattern in the development of the chick humerus. *J Embryol Exp Morphol* **61**, 191-205.

**Storm, E. E., Huynh, T. V., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Kingsley, D. M. and Lee, S. J.** (1994). Limb alterations in brachypodism mice due to mutations in a new member of the TGF beta-superfamily. *Nature* **368**, 639-43.

**Storm, E. E. and Kingsley, D. M.** (1996). Joint patterning defects caused by single and double mutations in members of the bone morphogenetic protein (BMP) family. *Development* **122**, 3969-79.

**Storm, E. E. and Kingsley, D. M.** (1999). GDF5 coordinates bone and joint formation during digit development. *Dev Biol* **209**, 11-27.

**Strecker, T. R. and Stephens, T. D.** (1983). Peripheral nerves do not play a trophic role in limb skeletal morphogenesis. *Teratology* **27**, 159-67.

**Stryke, D., Kawamoto, M., Huang, C. C., Johns, S. J., King, L. A., Harper, C. A., Meng, E. C., Lee, R. E., Yee, A., L'Italien, L. et al.** (2003). BayGenomics: a resource of insertional mutations in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* **31**, 278-81.

**Stuhmer, T., Anderson, S. A., Ekker, M. and Rubenstein, J. L.** (2002). Ectopic expression of the *Dlx* genes induces glutamic acid decarboxylase and *Dlx* expression. *Development* **129**, 245-52.

**Summerbell, D.** (1974). A quantitative analysis of the effect of excision of the AER from the chick limb-bud. *J Embryol Exp Morphol* **32**, 651-60.

- Summerbell, D.** (1976). A descriptive study of the rate of elongation and differentiation of the skeleton of the developing chick wing. *J Embryol Exp Morphol* **35**, 241-60.
- Summerbell, D., Lewis, J. H. and Wolpert, L.** (1973). Positional information in chick limb morphogenesis. *Nature* **244**, 492-6.
- Sun, X., Lewandoski, M., Meyers, E. N., Liu, Y. H., Maxson, R. E., Jr. and Martin, G. R.** (2000). Conditional inactivation of Fgf4 reveals complexity of signalling during limb bud development. *Nat Genet* **25**, 83-6.
- Sun, X., Mariani, F. V. and Martin, G. R.** (2002). Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development. *Nature* **418**, 501-8.
- Sun, X., Meyers, E. N., Lewandoski, M. and Martin, G. R.** (1999). Targeted disruption of Fgf8 causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo. *Genes Dev* **13**, 1834-46.
- Suzuki, T., Hasso, S. M. and Fallon, J. F.** (2008). Unique SMAD1/5/8 activity at the phalanx-forming region determines digit identity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 4185-90.
- Suzuki, T., Takeuchi, J., Koshiba-Takeuchi, K. and Ogura, T.** (2004). Tbx Genes Specify Posterior Digit Identity through Shh and BMP Signaling. *Dev Cell* **6**, 43-53.
- Szeto, D. P., Rodriguez-Esteban, C., Ryan, A. K., O'Connell, S. M., Liu, F., Kioussi, C., Gleiberman, A. S., Izpisua-Belmonte, J. C. and Rosenfeld, M. G.** (1999). Role of the Bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development. *Genes Dev* **13**, 484-94.
- Takebe, A., Era, T., Okada, M., Martin Jakt, L., Kuroda, Y. and Nishikawa, S.** (2006). Microarray analysis of PDGFR alpha+ populations in ES cell differentiation culture identifies genes involved in differentiation of mesoderm and mesenchyme including ARID3b that is essential for development of embryonic mesenchymal cells. *Dev Biol* **293**, 25-37.
- Takeuchi, J. K., Koshiba-Takeuchi, K., Matsumoto, K., Vogel-Hopker, A., Naitoh-Matsuo, M., Ogura, K., Takahashi, N., Yasuda, K. and Ogura, T.** (1999). Tbx5 and Tbx4 genes determine the wing/leg identity of limb buds. *Nature* **398**, 810-4.
- Tanaka, M., Tamura, K., Noji, S., Nohno, T. and Ide, H.** (1997). Induction of additional limb at the dorsal-ventral boundary of a chick embryo. *Dev Biol* **182**, 191-203.
- Tavares, A. T., Tsukui, T. and Izpisua Belmonte, J. C.** (2000). Evidence that members of the Cut/Cux/CDP family may be involved in AER positioning and polarizing activity during chick limb development. *Development* **127**, 5133-44.
- Threadgill, D. W., Dlugosz, A. A., Hansen, L. A., Tennenbaum, T., Lichti, U., Yee, D., LaMantia, C., Mouton, T., Herrup, K., Harris, R. C. et al.** (1995). Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* **269**, 230-4.
- Tickle, C.** (2003). Patterning systems--from one end of the limb to the other. *Dev Cell* **4**, 449-58.
- Tickle, C.** (2006). Making digit patterns in the vertebrate limb. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 45-53.
- Todt, W. L. and Fallon, J. F.** (1984). Development of the apical ectodermal ridge in the chick wing bud. *J Embryol Exp Morphol* **80**, 21-41.
- Towers, M., Mahood, R., Yin, Y. and Tickle, C.** (2008). Integration of growth and specification in chick wing digit-patterning. *Nature* **452**, 882-6.
- Treichel, D., Schock, F., Jackle, H., Gruss, P. and Mansouri, A.** (2003). mBtd is required to maintain signaling during murine limb development. *Genes Dev* **17**, 2630-5.

- Tsang, M., Kim, R., de Caestecker, M. P., Kudoh, T., Roberts, A. B. and Dawid, I. B.** (2000). Zebrafish *nma* is involved in TGFbeta family signaling. *Genesis* **28**, 47-57.
- Valentine, S. A., Chen, G., Shandala, T., Fernandez, J., Mische, S., Saint, R. and Courey, A. J.** (1998). Dorsal-mediated repression requires the formation of a multiprotein repression complex at the ventral silencer. *Mol Cell Biol* **18**, 6584-94.
- Vargesson, N., Clarke, J. D., Vincent, K., Coles, C., Wolpert, L. and Tickle, C.** (1997). Cell fate in the chick limb bud and relationship to gene expression. *Development* **124**, 1909-18.
- Verheyden, J. M. and Sun, X.** (2008). An Fgf/Gremlin inhibitory feedback loop triggers termination of limb bud outgrowth. *Nature* **454**, 638-41.
- Vogel, A., Rodriguez, C. and Izpisua-Belmonte, J. C.** (1996). Involvement of FGF-8 in initiation, outgrowth and patterning of the vertebrate limb. *Development* **122**, 1737-50.
- Vogel, A., Rodriguez, C., Warnken, W. and Izpisua Belmonte, J. C.** (1995). Dorsal cell fate specified by chick *Lmx1* during vertebrate limb development. *Nature* **378**, 716-20.
- Wagner, E. F. and Karsenty, G.** (2001). Genetic control of skeletal development. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 527-32.
- Wanek, N., Muneoka, K., Holler-Dinsmore, G., Burton, R. and Bryant, S. V.** (1989). A staging system for mouse limb development. *J Exp Zool* **249**, 41-9.
- Wang, C. K., Omi, M., Ferrari, D., Cheng, H. C., Lizarraga, G., Chin, H. J., Upholt, W. B., Dealy, C. N. and Kosher, R. A.** (2004). Function of BMPs in the apical ectoderm of the developing mouse limb. *Dev Biol* **269**, 109-22.
- Webb, C. F., Das, C., Coffman, R. L. and Tucker, P. W.** (1989). Induction of immunoglobulin mu mRNA in a B cell transfectant stimulated with interleukin-5 and a T-dependent antigen. *J Immunol* **143**, 3934-9.
- Webb, C. F., Das, C., Eaton, S., Calame, K. and Tucker, P. W.** (1991). Novel protein-DNA interactions associated with increased immunoglobulin transcription in response to antigen plus interleukin-5. *Mol Cell Biol* **11**, 5197-205.
- Webb, C. F., Smith, E. A., Medina, K. L., Buchanan, K. L., Smithson, G. and Dou, S.** (1998). Expression of *bright* at two distinct stages of B lymphocyte development. *J Immunol* **160**, 4747-54.
- Wiens, D., Jensen, L., Jasper, J. and Becker, J.** (1995). Developmental expression of connexins in the chick embryo myocardium and other tissues. *Anat Rec* **241**, 541-53.
- Wilkinson, D. G. and Nieto, M. A.** (1993). Detection of messenger RNA by in situ hybridization to tissue sections and whole mount. *Methods Enzymol* **225**, 361-373.
- Wilsker, D., Patsialou, A., Dallas, P. B. and Moran, E.** (2002). ARID proteins: a diverse family of DNA binding proteins implicated in the control of cell growth, differentiation, and development. *Cell Growth Differ* **13**, 95-106.
- Wilsker, D., Probst, L., Wain, H., M., Maltais, L., Tucker, P. W. and Moran, E.** (2005). Nomenclature of the ARID family of DNA-binding proteins. *Genomics* **86**, 242-251.
- Wimmer, E. A., Jackle, H., Pfeifle, C. and Cohen, S. M.** (1993). A Drosophila homologue of human Sp1 is a head-specific segmentation gene. *Nature* **366**, 690-4.
- Wolpert, L. and Hornbruch, A.** (1987). Positional signalling and the development of the humerus in the chick limb bud. *Development* **100**, 333-8.
- Wolpert, L., Tickle, C. and Sampford, M.** (1979). The effect of cell killing by x-irradiation on pattern formation in the chick limb. *J Embryol Exp Morphol* **50**, 175-93.

- Xu, J., Liu, Z. and Ornitz, D. M.** (2000). Temporal and spatial gradients of Fgf8 and Fgf17 regulate proliferation and differentiation of midline cerebellar structures. *Development* **127**, 1833-43.
- Xu, X., Weinstein, M., Li, C., Naski, M., Cohen, R. I., Ornitz, D. M., Leder, P. and Deng, C.** (1998). Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-mediated reciprocal regulation loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction. *Development* **125**, 753-65.
- Xue, D., Tu, Y. and Chalfie, M.** (1993). Cooperative interactions between the *Caenorhabditis elegans* homeoproteins UNC-86 and MEC-3. *Science* **261**, 1324-8.
- Yang, Y., Drossopoulou, G., Chuang, P. T., Duprez, D., Marti, E., Bumcrot, D., Vargesson, N., Clarke, J., Niswander, L., McMahon, A. et al.** (1997). Relationship between dose, distance and time in Sonic Hedgehog-mediated regulation of anteroposterior polarity in the chick limb. *Development* **124**, 4393-404.
- Yang, Y. and Niswander, L.** (1995). Interaction between the signaling molecules WNT7a and SHH during vertebrate limb development: dorsal signals regulate anteroposterior patterning. *Cell* **80**, 939-47.
- Yi, S. E., Daluiski, A., Pederson, R., Rosen, V. and Lyons, K. M.** (2000). The type I BMP receptor BMPRII is required for chondrogenesis in the mouse limb. *Development* **127**, 621-30.
- Yu, K. and Ornitz, D. M.** (2008). FGF signaling regulates mesenchymal differentiation and skeletal patterning along the limb bud proximodistal axis. *Development* **135**, 483-91.
- Zeller, R.** (2004). It takes time to make a pinky: unexpected insights into how SHH patterns vertebrate digits. *Sci STKE* **2004**, pe53.
- Zhang.** (1999). Limbs move beyond the Radical fringe. *Nature* **399**.
- Zhang, X., Ibrahimi, O. A., Olsen, S. K., Umemori, H., Mohammadi, M. and Ornitz, D. M.** (2006). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *J. Biol. Chem* **281**, 15694-15700.
- Zhu, J., Nakamura, E., Nguyen, M. T., Bao, X., Akiyama, H. and Mackem, S.** (2008). Uncoupling Sonic hedgehog control of pattern and expansion of the developing limb bud. *Dev Cell* **14**, 624-32.
- Zhurinsky, J., Shtutman, M. and Ben-Ze'ev, A.** (2000). Differential mechanisms of LEF/TCF family-dependent transcriptional activation by beta-catenin and plakoglobin. *Mol Cell Biol* **20**, 4238-52.
- Zorn, A. M.** (2001). Wnt signalling: antagonistic Dickkopfs. *Curr Biol* **11**, R592-5.
- Zou, H. and Niswander, L.** (1996). Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation. *Science* **272**, 738-41.
- Zuniga, A., Haramis, A. P., McMahon, A. P. and Zeller, R.** (1999). Signal relay by BMP antagonism controls the SHH/FGF4 feedback loop in vertebrate limb buds. *Nature* **401**, 598-602.
- Zuzarte-Luis, V., Montero, J. A., Rodriguez-Leon, J., Merino, R., Rodriguez-Rey, J. C. and Hurle, J. M.** (2004). A new role for BMP5 during limb development acting through the synergic activation of Smad and MAPK pathways. *Dev Biol* **272**, 39-52.

## Review

# Digit morphogenesis: Is the tip different?

Jesús C. Casanova and Juan José Sanz-Ezquerro<sup>\*,†</sup>

Department of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Darwin, 3, 28049 Madrid, Spain

Digit formation is the last step in the skeletal patterning of developing limbs. This process involves important aspects such as determination of chondrogenic versus interdigital areas; growth of digital rays with periodic segmentation to form joints and thus phalanges, and finally tip formation. Traditionally it was believed that the properties of digital rays were fixed at earlier stages, but recently a surprising plasticity of digit primordia at the time of condensation has been demonstrated. This implies the presence of local interactions that are able to modulate the particular programs that make a given digit, but we don't fully understand how they operate. An involvement of signaling from the interdigital spaces and from the apical ectodermal ridge has been proposed. Another interesting question is the formation of the last limb structure, digit tips, which may involve a specific molecular and cellular program. Indeed, the expression of several developmentally important genes is restricted to digit tips at late stages of limb development. Understanding the molecular and cellular interactions that lead to digit morphogenesis has important implications not only in the context of embryonic development (for example, how early cues received by cells are translated into anatomy or what are the mechanisms that control the cease of activity of signaling regions) but also in terms of limb diversification during evolution.

**Key words:** BAMBI, bone morphogenetic protein, chick, digit morphogenesis, joint, limb, nail, segmentation, Sonic hedgehog, tip.

## Limb development

Limb development has been a classic model to study pattern formation during embryonic development since it constitutes an amenable system to analyze how a group of undifferentiated cells give rise to a complex anatomical structure (Tickle 2000; Capdevila & Izpisua Belmonte 2001; Mariani & Martin 2003; Niswander 2003; Talamillo *et al.* 2005). Basic cellular activities such as cell proliferation, differentiation, cell death or intercellular signaling take place during limb bud initiation and outgrowth and the interplay between all of these cellular behaviors together with the genetic history of cells (lineage) will lead to the formation of specific structures at precise locations. Despite

considerable recent advances in our understanding of how limbs develop (reviewed in Tickle 2003), a major unresolved question is how the positional information that cells acquire at early steps of limb bud outgrowth is translated into anatomy at later stages, to form the complex array of tissues with distinctive morphological and functional characteristics that constitutes a limb. Another important question that has not been addressed is how a limb stops growing after all pattern formation has taken place and is then finished with the formation of digit tips.

Limbs arise in the flank of embryos from the lateral plate mesoderm as small buds composed of mesenchymal cells encased in ectoderm. Epithelial–mesenchymal interactions are crucial for the emergence of limb buds and the core of this process is the establishment of a reciprocal loop based on Fgf signaling, between Fgf10 in the mesenchyme and Fgf8 in the ectoderm (Ohuchi *et al.* 1997). The consequence of this initial induction is the formation of the apical ectodermal ridge (AER), a specialized epithelium that arises at the tip of the limb bud and is essential for its proximo-distal outgrowth (Saunders 1948). An important aspect in this process is the location of the AER at the dorso-ventral boundary

\*Author to whom all correspondence should be addressed.

<sup>†</sup>Present address: Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Melchor Fernández Almagro, 3, 28029 Madrid, Spain.

Email: jjsanz@cnic.es

Received 15 March 2007; revised 7 May 2007; accepted 17 May 2007.

© 2007 The Authors

Journal compilation © 2007 Japanese Society of Developmental Biologists



(Altabef *et al.* 1997) and an involvement of the dorso-ventral ectodermal pathway governed by En-1 has been shown to be essential (Altabef *et al.* 1997; Loomis *et al.* 1998). The genetic cascades implicated in the induction of the AER have been deeply analyzed and we know many of the players involved (Kawakami *et al.* 2001). For instance, the Wnt signaling pathway acting through Wnt3a and beta catenin is involved in the induction of Fgf8 expression in the AER (Kengaku *et al.* 1998), as is the bone morphogenetic protein (BMP) pathway, acting both on Fgf8 induction through Msx2 and in the dorso-ventral pathway regulating En-1 (Ahn *et al.* 2001; Pizette *et al.* 2001). Recently a role for the transcription factors Sp8 and Sp9 has also been demonstrated (Bell *et al.* 2003; Treichel *et al.* 2003; Kawakami *et al.* 2004). However, less is known about the mechanisms that lead to the maturation and stabilization of the AER, mainly by a process of cellular compaction (Kimmel *et al.* 2000). We are interested in this process and we have new candidate genes that may play a role (JCC and JJSE unpubl. obs.), but we will focus this contribution on later steps of limb formation, namely digit morphogenesis.

When limb buds emerge due to the above-mentioned interactions, the major signaling centers that will direct outgrowth and patterning along the three main axes (proximo-distal, antero-posterior and dorso-ventral) are established. Apart from the already referred AER, another pivotal role is played by the polarizing region, a group of posterior mesenchymal cells that direct patterning across the antero-posterior axis through the production of the signaling molecule Sonic hedgehog (Tickle *et al.* 1975; Riddle *et al.* 1993; Tickle 2002). The polarizing region determines the number and identity of the digits that will form. It does so through the control of the balance between the activator and repressor forms of the Gli3 transcription factor (Wang *et al.* 2000; Litingtung *et al.* 2002). Although initially considered to act through a morphogen gradient mechanism determining digit identity in a concentration threshold fashion (Yang *et al.* 1997), recently a more complex mechanism has been proposed to explain its control of digit patterning, which involves both the regulation of Shh protein distribution (spatial gradient) and the time of exposure (temporal gradient) (Harfe *et al.* 2004).

During limb outgrowth the different elements of the cartilage skeleton are laid down in a proximal to distal sequence, starting with the stylopod (humerus/femur), then zeugopod (radius-ulna/tibia-fibula) and finally the autopod, digits being the last specified structures. The cartilage elements are formed by condensation of mesenchymal cells that will then enter the chondrocyte differentiation pathway (Wagner

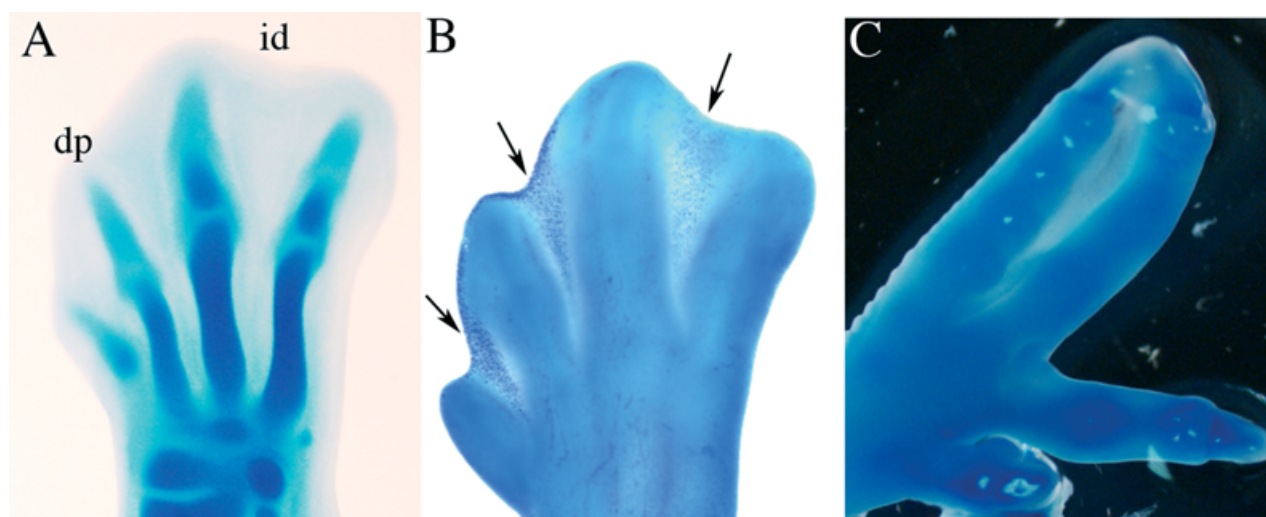
& Karsenty 2001). Later on, the cartilage template is replaced by bone by an endochondral ossification process (Karsenty & Wagner 2002; Kronenberg 2003).

In this contribution we review recent progress on digit morphogenesis and speculate about the fact that digit tips are special structures with differential characteristics and a particular molecular program. As a new example we have observed the expression of BAMBI, an inhibitor of BMP signaling, in digit tips of chicken embryos at late stages of limb development.

## Digit morphogenesis

During the proximo-distal patterning of limbs, digits are the last elements to be laid down. Digits are established as chondrogenic condensations that form in the autopod along the antero-posterior axis and are separated by interdigital spaces. The sequence of condensation is characteristic and in most cases begins with the penultimate posterior digit, followed by a posterior to anterior progression. An exception to this general pattern is condensations in urodele amphibians, where anterior digits condense first, progressing then in an anterior to posterior sequence (Shubin & Alberch 1986).

One can distinguish different stages in the formation of digits: initial condensation; elongation and segmentation; and finally tip formation (Sanz-Ezquerro & Tickle 2003a). Initially, the regions of the autopod that will make the condensations (digital rays) are defined in contraposition to those that will form the interdigital spaces (Fig. 1A). This will determine the different outcome of cells in both regions, since condensations will progress to make cartilage, whereas interdigital cells ultimately will die by apoptosis (Fig. 1B). Although we don't know which factors determine the exact location of the initial condensations, we have begun to understand the molecular mechanisms underlying digit formation. We can distinguish two steps in the formation of cartilage elements (Hall & Miyake 2000): initial condensation of mesenchymal cells to form prechondrogenic aggregates, where changes in the morphology, shape and adhesion properties of cells occur, and subsequent differentiation of these aggregates into chondrocytes that produce specific extracellular matrix components such as type II collagen. Important roles for Sox family transcription factors and signaling from transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) superfamily molecules have been demonstrated in these processes. Transcription factors of the Sox family, in particular Sox9, are the first known molecular markers in condensations and seem to have a functional role in the initial formation of condensations (Chimal-Monroy *et al.* 2003). Also, manipulations of BMP receptors signaling pathway

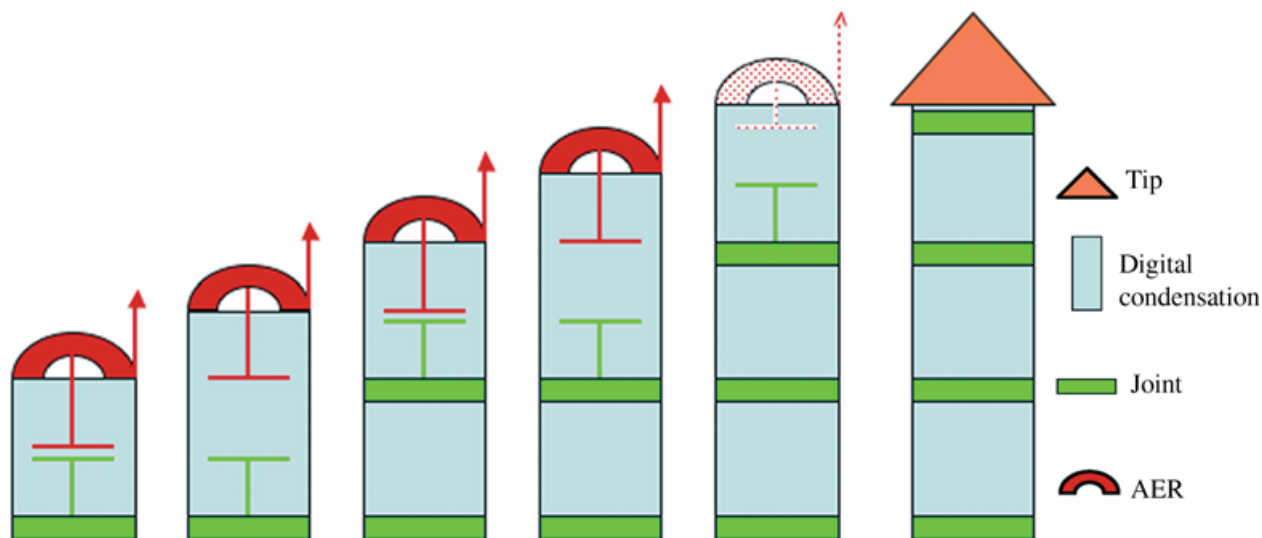


**Fig. 1.** A. Stage 30 chick leg bud stained with alcian blue to reveal cartilage. Note condensations in the four digital rays and no staining in interdigital regions. Also present are metatarso-phalangeal joints at the base of digits 2, 3 and 4. dp, digit primordia; id, interdigital space. B. Stage 32 chick leg bud stained with Nile Blue to reveal apoptotic cells in interdigital regions (arrows). Distal is top and posterior is right for A and B. C. Syndactyly between digits 3 and 4 in a chick leg six days after application of a bead covered with Shh-producing cells at stage 28. Note persistence of interdigital tissue and joining of the digits at tips. Ventral view.

(activation or inhibition) and direct application of factors have shown that members of the TGF $\beta$  superfamily of molecules play crucial roles. Gain and loss of function experiments in chick limbs (Zou *et al.* 1997) and conditional knock-out models in mice of BMPR-1a and BMPR-1b (Yoon *et al.* 2005) have demonstrated an essential function of BMP signaling in chondrogenic condensation. Moreover, general inhibition of BMPs through noggin dramatically affects condensation and chondrogenesis (Pizette & Niswander 2000). In experiments where local application of these factors was achieved by using beads in chick limbs, it has been shown that TGF $\beta$ s act as chondrogenic signals, whereas BMPs have mainly an apoptosis inducing effect, and the expression of these molecules correlate with chondrogenic or apoptotic areas (Ganan *et al.* 1996; Macias *et al.* 1997). The divergent fate of cells seems to be determined by the initial steps and probably involves the acquisition of differential competence of cells to respond to the same signals. Exposure for instance to BMPs will cause enlargement of cartilage in digital rays, but will increase apoptosis in interdigital regions (Ganan *et al.* 1996; Macias *et al.* 1997). However, the interdigital tissue retains a high chondrogenic potential, since it can give rise to cartilage or even extra-digits when diverted from the apoptotic program by different manipulations, such as exposure to chondrogenic signals (TGF $\beta$  beads [Ganan *et al.* 1996]), isolation and culture *in vitro* (Lee *et al.* 1994) or *in vivo* (i.e. recombinant limbs) (Ros *et al.* 1997) or transplantation to an ectopic

location (JJSE unpubl. obs.). Because of the presence of this latent chondrogenic potential, it has been proposed that an inhibitory effect is exerted normally on interdigital cells to prevent chondrogenesis (Tang *et al.* 2000). This inhibition could come from the ectoderm or from adjacent digital rays, but a clear demonstration of a lateral inhibition system to account for spacing between digits has not been provided. Apoptosis of interdigital cells helps in separating the digits and if this process fails, syndactyly occurs. It has been shown that a block in BMP signaling can cause this effect (Yokouchi *et al.* 1996; Zou & Niswander 1996) and application of ectopic Shh to interdigital regions prevents cell death too (Fig. 1C [Sanz-Ezquerro & Tickle 2000]). Also, hyperactivation of Fgf signaling (Lu *et al.* 2006), including human syndromes such as Apert syndrome (Wilkie *et al.* 2002) and blockade of Notch signaling in the AER (Francis *et al.* 2005) can lead to this phenotype.

After the condensations have been established, digital rays elongate and periodically segment to form interphalangeal joints and thus generate a precise number of phalanges. The formation of phalanges is a patterning process since the number of elements is characteristic of a particular digit according to its antero-posterior location. The mechanism of generation of phalanges is not well understood, but it has to coordinate growth of the digital ray with periodic formation of a new joint. Two aspects are then relevant: induction of the molecular components that characterize the joint, and spacing between joints.



**Fig. 2.** Model for growth and periodical segmentation in the formation of digit joints. The distal apical ectodermal ridge (AER) would have at least two functions, probably mediated by the secretion of Fgf8. On one hand it promotes growth of the digital ray (blue) in a distal direction (red arrow). On the other hand, it inhibits the formation of a joint distally, while also inhibiting the program to make the tip (red bar). As long as Fgf8 is expressed, this growth persists. A newly formed joint (green) is only formed when cells in the digital condensation escape from the distal AER inhibitory effect, but also from the proximal inhibition that every joint exerts on neighboring cells (green bar), probably mediated by inhibitors of the bone morphogenetic protein (BMP) signaling pathway. Once both inhibitory effects are surpassed, joint inducer molecules such as Wnt14 will act to promote the expression of joint markers such as Gdf5. When Fgf8 expression finishes, a joint forms abruptly in the distal region of the digit and the specific molecular program to make the last phalanx or tip is induced (orange).

Numerous genes are expressed in joints and can be used as molecular markers. Among them it is noteworthy the presence of members of the BMP signaling pathway and its inhibitors, such as BMP2 and chordin (Archer *et al.* 2003). Notably, noggin seems to have a relevant role, since null mice lack joints (Brunet *et al.* 1998). However, the most specific and functionally relevant gene seems to be another member of the TGF $\beta$  superfamily, Gdf5. It is expressed in all joints and mutations in Gdf5 in both mouse and humans produce defects in joint formation (Storm *et al.* 1994; Storm & Kingsley 1996). However, Gdf5 can't act as a joint inducer (Francis-West *et al.* 1999; Merino *et al.* 1999a; Storm & Kingsley 1999), and this property has only been demonstrated so far for a member of the Wnt family, Wnt14. Misexpression of Wnt14 in limbs leads to ectopic joint formation (Hartmann & Tabin 2001). The fact that the overexpression of Wnt14 next to an endogenous joint blocks its normal formation together with the expression of inhibitory molecules for the BMP pathway, such as noggin and chordin, in joints, has led to the proposal that an autoinhibitory mechanism may be operating in the spacing of joints. After a new joint is specified, the formation of a new one next to it would be prevented because of the production of these secreted inhibitors. Growth of the primordia would then eliminate

this inhibition at a distance, and a new joint would be induced. This process would be repeated periodically as long as the digital ray keeps on growing (Fig. 2). The threshold for this putative inhibitory effect could be different for different digits, and this could be related to the number of phalanges that eventually form. If the threshold is lower for a given digit, it would form joints more often, and thus more phalanges, and this could correlate with the position and then identity of the digit. A suggestive indication for this is the fact that the production of extra phalanges on application of Shh to the interdigits seems to be different for different positions, being easier to produce an extra phalanx in posterior toes (which have more phalanges normally) than in anterior ones (Sanz-Ezquerro & Tickle 2003b). This problem is not trivial, since we don't really know whether the initial condensations that form phalanges are, for instance, similar in size or not. A detailed morphometric analysis of these early condensation steps would help in our understanding of phalanx formation and joint spacing. Another important observation is that joints don't arise distally, close to the AER. This points out to the possible existence of another source of inhibitory factors, located distally, that would prevent formation of a joint distally (Fig. 2). Fgf8 from the AER acting as an antidifferentiation molecule could

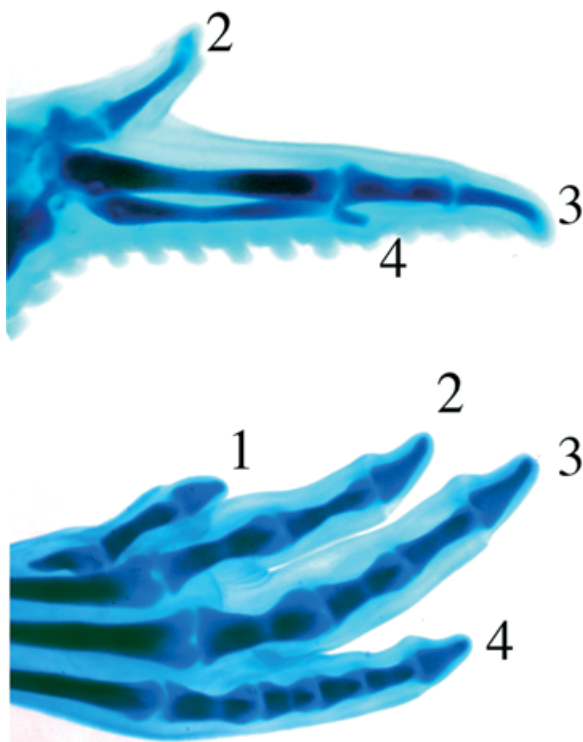
mediate this effect. We actually have preliminary data showing that exogenously applied Fgfs can inhibit joint formation and expression of GDF5 (JJSE unpubl. data).

### The question of digit identity

Digit identity can be defined as the type of digit that develops in a particular position. The collective morphological features of a digit that make it distinct from others are the overall length and especially the number of phalanges and their morphology. In mouse and human both fore and hind limbs have five digits, and it is easy to distinguish the most anterior (digit 1) and posterior (digit 5) from the others. However, it is more difficult to assess the identity of the three middle digits, since all of them have three phalanges and a similar size and shape. Chicken limbs have long been used as a model system in experimental embryology, mainly because of the accessibility to surgical manipulations. Another reason for their use in patterning studies is precisely that digits can be easily distinguished, both in wings and in legs (Fig. 3). The chicken wing has only three digits that are morphologically very different. From anterior, digit 2 has two phalanges, digit 3 has two

and digit 4 has only one. (Nomenclature of wing digits as 2, 3, and 4 is the standard used in developmental biology based on embryological data, although the identity and homology of digits in the wing from an evolutionary perspective is a long-standing controversy. Defenders of a theropod dinosaur origin of birds alternatively propose a 1, 2, 3 identity of wing digits, based mainly on paleontological data, but this discussion is out of our scope here. The reader is invited to consult recent reviews for more information) (Feduccia 2001; Galis *et al.* 2005; Vargas & Fallon 2005; Welten *et al.* 2005). Also, the number of phalanges in wing digits has been debated. The number used here refers to the embryo at the stages of digit condensation and growth. Fusion of elements occur at later stages and several condensations in the embryo can appear as a single bony element in adults, and this fact has led to different descriptions in the number of phalanges. A good model to avoid this uncertainty is the chicken leg, because all digits (toes) have a clearly different number of phalanges according to their position. Chicken legs have four digits, and from more anterior to more posterior toes the number of phalanges is: toe I (two phalanges), II (three), III (four) and IV (five) (Fig. 3). In all of these numberings the last phalange (ungueal) or tip is included.

It has already been mentioned that controversy exists between, and even among, paleontologists and developmental biologists concerning digit identities (phenotypic differences between digits in the same limb), homologies (equivalence of digits between organisms and in evolutionary context) and their relationship with position. From a developmental point of view, the discrepancies arise when considering the possible mechanism used to give digits different identities, or even whether these really exist as such. The prevalent model over the past years to explain the determination of digit identity has been the positional information concept (Wolpert 1969; Wolpert 1989). According to this idea, cells in the early limb bud receive patterning cues from the polarizing region that inform them about their antero-posterior position. As a result they acquire a positional value that encodes this information. The positional information is later interpreted, leading to a program of differentiation to make the digit corresponding to a particular position. The classical model involves a gradient of a secreted molecule that will instruct different fates on cells depending on the concentration (morphogen) (Tickle *et al.* 1975). As we have mentioned, this simple concentration gradient mechanism may not be operating, and cells probably integrate in growing buds over time both concentration and length of exposure to



**Fig. 3.** Stage 36 (10 days incubation) chick limbs stained with alcian green to reveal cartilage. Upper panel shows a wing, with three digits. Lower panel shows a leg, with four toes.

Shh (Harfe *et al.* 2004). In any case, the problem persists as to how cells interpret previous inputs and their position to give rise to specific morphologies. An extreme view of the positional information model suggests that it is the mesenchymal cells themselves that are specified with a particular differentiation code (for instance of Hox genes) to generate distinct identities. This implies that positional properties of cells are specified cell autonomously and that once cells have received the instructions they are irreversibly committed to a particular digit differentiation program, so that digit identity is fixed at early stages. However, recent experiments have shown that the identity of digits may not be a fixed property at the time of condensation, and that manipulations at this late stage can lead to modification in the digit that will form, in particular the number of phalanges produced (Dahn & Fallon 2000; Sanz-Ezquerro & Tickle 2000; Sanz-Ezquerro & Tickle 2003b). An alternative proposal is that positional information is not established (at least not only) on chondrogenic cells in an autonomous way, but that the information is transmitted to other cells and tissues and is used to set up secondary patterning systems and local cellular interactions that will act on digital rays to execute the corresponding program. Because of this, changes can occur in individual digits independently of others. As usually happens in embryonic development, these secondary subroutines probably involve some of the same molecules and signaling pathways used in earlier steps. Moreover, regulatory feedback loops of the same nature as those used in earlier patterning may be implicated.

### Plasticity of digit primordia

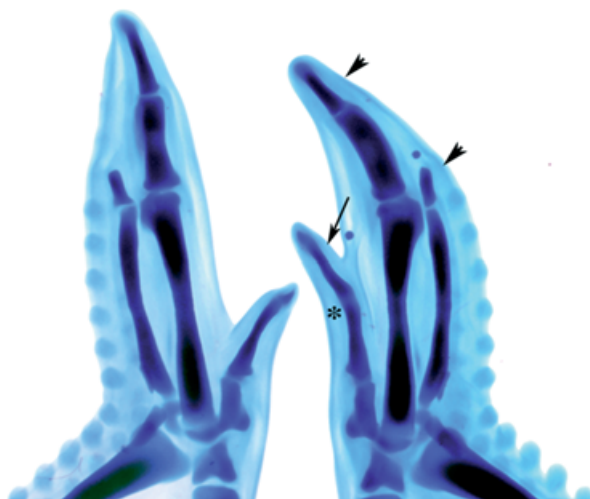
Evidence for local interactions determining digit morphogenesis comes from experiments carried out in chicken limbs at late stages, when digit condensations have already started in the autopod. Surgical manipulations of the surrounding tissues or interference with signaling pathways (such as Shh and BMPs or misexpression of Tbx2 and 3 genes) can alter the number of phalanges that will form (Dahn & Fallon 2000; Sanz-Ezquerro & Tickle 2003b; Suzuki *et al.* 2004). For example, bisection of digit primordia, removal of interdigital tissue or grafting of primordia to different interdigital spaces can produce digits with either more or less phalanges. This happens adopting the formula of the digit that would correspond to the most posterior interdigital environment to which the primordia is exposed (Dahn & Fallon 2000). Also, inhibition of BMP signaling through application of noggin-soaked beads to interdigits results in production of

digits that lack phalanges, and ectopic application of Shh to interdigital spaces increases the number of phalanges (Dahn & Fallon 2000; Sanz-Ezquerro & Tickle 2003b). Moreover, misexpression of Tbx2 and Tbx3 was shown to induce posterior transformations, whereas misexpression of mutant forms induced anterior transformations (Suzuki *et al.* 2004). These results show that, unexpectedly, digits can have either more or less phalanges, and thus be anteriorized or posteriorized. This is something that contrasts with earlier patterning from the polarizing region, where exposure to extra polarizing activity or Shh can only posteriorize digits (Yang *et al.* 1997). In any case, if we assume a definition of digit identity based only on the number of phalanges, the nature of the formed digit has changed. However, the problem persists as to whether adding or subtracting a phalange is really altering the specification of digit identity or only modifying the growth and joint induction pattern of a particular digit.

These results have been interpreted in terms of homeotic transformations of digits (change of identity of one digit into another (Dahn & Fallon 2000; Suzuki *et al.* 2004) but there are some points that do not support this conclusion, especially in experiments where application of Shh leads to extra phalanges. For instance, the most posterior digit can still give rise to an extra phalange, thus creating a new structure not existing in nature (a six phalange toe, a neomorphic element). Also, in some cases the morphology of the phalanges does not correspond to transformations. This is particularly clear in the wing, where application of Shh to the first interdigit leads to the production of a triphalangeal digit 2, very much resembling triphalangeal thumbs present in some human conditions (Fig. 4). In this case it seems clear that the longer digit 2 has not adopted the identity of the more posterior digit 3. Furthermore, the model put forward is that it is BMP signaling coming from the interdigits, probably interacting with Tbx genes for the posterior ones, which determines the number of phalanges, doing so in a posterior to anterior gradient of concentration in interdigital spaces. The evidence for this is that application of noggin beads is able to decrease the number of phalanges. However, a direct effect of BMPs in promoting more phalanges, as would be expected, is not seen, and the effect of noggin has instead been interpreted as a blockade in cartilage formation, rather as a genuine patterning change (Hartmann & Tabin 2001).

An alternative explanation to the direct control of digit identity by BMP signaling from the interdigits is an indirect effect through interactions with the AER. This is based on the fact that the effects of Shh in





**Fig. 4.** Elongation of digits in the wing after application of Sonic hedgehog (Shh). Beads soaked in Shh were implanted in interdigital spaces at stage 28. Five days later, only digit 2 had grown longer with formation of an extra phalanx (arrow) and joint (asterisk). However, neither digit 3 or 4 show extra growth (arrowheads).

elongating digits and inducing extra phalanges when applied interdigitally are mediated by its ability to prolong the expression of *Fgf8* in the AER (Sanz-Ezquerro & Tickle 2003b). In these experiments the production of an extra phalanx would reflect a prolonged growth of a given digit but not a posteriorizing homeotic transformation. The length of time the AER is active in allowing the growth of primordia would be then the parameter determining the number of phalanges. However, the control of this timing is not completely clear, since we don't know what tissue governs ultimately the activity of the AER at late stages. In a classic series of experiments (Rubin & Saunders 1972), it was proposed, based on heterochronic transplantations between ectoderm and mesenchyme, that 'the loss of inductive potency from the AER at stage 29 is intrinsically scheduled', that is, it resides in the ectoderm autonomously. However, based on the results of Shh in the interdigits, it has been hypothesized that possibly a loop exists between the mesenchyme and the AER, involving an inhibitor of BMPs, to maintain AER activity and *Fgf8* expression in each digit's AER, in a similar way to the Shh-Gremlin-*Fgf4* loop present in the early bud (Sanz-Ezquerro & Tickle 2003b). There, the maintenance of activity in the AER (as seen by *Fgf4* expression) depends on the expression of Gremlin in the mesenchyme, which is induced by Shh from the polarizing region (Zuniga *et al.* 1999). The presence of such a maintenance factor has been proposed for each

digital ray. However, no direct evidence for their existence has been obtained to date.

Another issue is that since application of Shh is able to produce a new joint, the question arises as to whether this effect is really due to a direct interference with the joint-forming program and not to a change of digit identity. Several observations do not support this interpretation. First, elongation and joint formation is only seen in the penultimate phalanx and application of beads more proximally do not produce this effect nor alter other joints. Second, the induction of the new joint occurs usually away from the bead and some time later after its application, so a direct effect seems difficult to explain. Finally, it has been shown that widespread overexpression of Shh or Indian hedgehog (*Ihh*) in the digits actually inhibits the production of joints (Merino *et al.* 1999a). Based on these facts we favor the interpretation that the extra joint is due to the prolonged activity of the endogenous periodic joint induction program caused by extra growth of the digit primordia.

An interesting observation is that digits in the wing seem to behave differently than toes in the leg in these experiments. Although application of Shh to the interdigits is able to elongate and induce extra phalanges in every toe, as well as in digit 2 in the wing, digits 3 and 4 were never elongated (Fig. 4) (Sanz-Ezquerro & Tickle 2003b). This refractory property is not understood, but could reflect special properties of these digits related to the highly adaptive nature of wings. Interestingly, digits 3 and 4 lack any claw, which in contrast is present in digit 2. This, together with the apparently different ossification pattern in these digits suggests that they do not possess a competent distal 'tip-forming area' and that they are indeed truncated digits. This would explain the absence of elongation in response to Shh.

### Digit tips

The fact that the last phalanx of digits, anatomically called ungual, has some distinctive characteristics is evident, but the significance of this has not been widely recognized. Evidence for tips being different comprise anatomical, histological, molecular and functional aspects. The most conspicuous of them is the presence of nails and claws, specialized ectodermal appendages present only in the tips of digits. Also, the ossification pattern of the last phalanx differs to that of proximal and medial ones. They have a distal ossification center and a single growth plate, next to the last joint, and in many species, including mouse and human, the ossification precedes that of medial phalanges, being somehow premature. The cellular

mechanisms for this and its functional relevance remain to be addressed. Another differential feature is the vascular pattern of the tip. This is related to the presence of the nail, which has its own specialized micro vascular system, and makes the overall irrigation of the distal phalange different to the others.

An intriguing property of digit tips is that they retain the ability to regenerate after amputation, being one of the few cases in higher vertebrates where this potential is observed (Borgens 1982; Muller *et al.* 1999). This contrasts with the capacity for full limb regeneration present in urodele amphibians (Nye *et al.* 2003). Although we don't fully understand the molecular basis for digit tip regeneration, it has been shown to be restricted to amputations distal to the last joint and to correlate with expression of *Msx1* (Reginelli *et al.* 1995). An involvement of BMP signaling has also been demonstrated (Han *et al.* 2003).

The proposal that there may be a special program that controls the formation of the last phalange independently of the proximal ones is supported by several observations. First, mouse null for *Shh* present only a rudimentary digit composed of unsegmented cartilage, but the tip and last joint are present, and more importantly a claw is evident (Kraus *et al.* 2001). Furthermore, there are human conditions, particularly some types of brachydactyly, where there is absence of medial phalanges, but the tip is still well formed. Interestingly, mutations in *Ihh* have been shown to

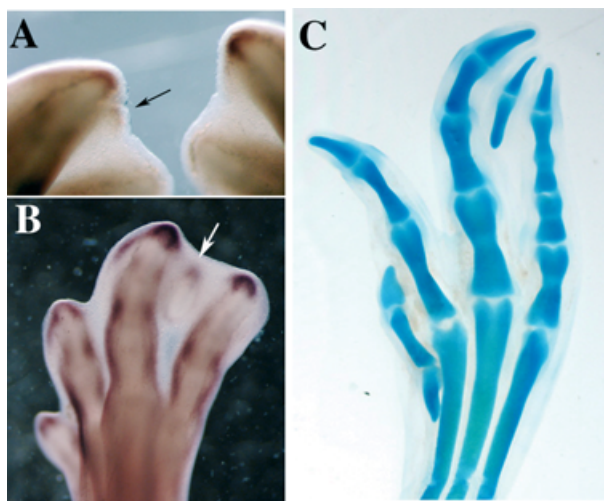
be the cause of some of these (Gao *et al.* 2001) and in many mouse models with alterations in signaling pathways, again there may be defects or absence of medial phalanges but tips are present (Baur *et al.* 2000; Lewandoski *et al.* 2000; Kruger *et al.* 2001; Albrecht *et al.* 2002).

Finally, there are a number of genes that are expressed specifically in the distal phalange during digit morphogenesis. Apart from those obviously involved in common chondrogenic and osteogenic pathways, such as *Sox9* or *Ihh*, which are expressed in all phalanges at distinct differentiation steps, these include other developmentally important genes that seem to be expressed specifically in the tips. These include members of the BMP signaling pathway such as *BMP4* (Han *et al.* 2003), *BMP7* (Macias *et al.* 1997) or *BMP5* (Zuzarte-Luis *et al.* 2004); Wnt family, such as *Wnt14* (Sanz-Ezquerro & Tickle 2003b); *Msx* and *Dlx* genes and others (Table 1). This specific expression is present either in mesenchyme or ectoderm, and could be related to the special characteristics of tips in terms of skeletal differentiation, ectodermal appendages or regenerative ability. Since some of these genes are activated when the last phalange is being formed, it has been proposed that a particular molecular program exists, which controls tip formation. For instance, *Wnt14* is indeed activated in tips of extra digits when they are induced in interdigital spaces (Fig. 5). To gain insight into this

**Table 1.** Selected genes with specific expression in digit tips

Gene	Type of molecule	Function in digit tips	Reference, organism
<i>Msx1</i>	Transcription factor	Mediates regeneration of digit tips through control of BMP4	(Han <i>et al.</i> 2003) Mouse
<i>Msx2</i>	Transcription factor	Expression of BMP4 but not involved in regenerative response	"
<i>BMP4</i>	Signaling molecule	Regeneration of digit tips	"
<i>BMP7</i>	Signaling molecule	Unknown	(Macias <i>et al.</i> 1997) Chick
<i>TGFβ2</i>	Signaling molecule	Chondrogenesis?	(Merino <i>et al.</i> 1998) Chick
<i>Activin βB</i>	Signaling molecule	Chondrogenesis?	(Merino <i>et al.</i> 1999b) Chick
<i>Wnt 14</i>	Signaling molecule	Unknown	(Sanz-Ezquerro & Tickle 2003b) Chick
<i>BAMBI</i>	Pseudoreceptor	Unknown	(Grotewold <i>et al.</i> 2001) Mouse
<i>Netrin-1</i>	Secreted protein	Unknown	This paper, Chick
<i>Unc5H2</i>	Netrin- receptor	Unknown	(Engelkamp 2002) Mouse
<i>Dlx5</i>	Transcription factor	Unknown	"
<i>Dachshund</i>	Transcription factor	Unknown	(Acampora <i>et al.</i> 1999) Mouse
<i>MSal-3</i>	Transcription factor	Unknown	(Davis <i>et al.</i> 1999; Hammond <i>et al.</i> 1998) Mouse
<i>Sall1</i>	Transcription factor	Unknown	(Ott <i>et al.</i> 2001) Mouse
<i>HoxC13</i>	Transcription factor	Nail development?	(Buck <i>et al.</i> 2001; Nishinakamura <i>et al.</i> 2001) Mouse
<i>R-Spo4</i>	Secreted protein	Nail induction? (Mutations in humans cause anonychia)	(Godwin & Capecchi 1998) Mouse
	Wnt pathway		(Blaydon <i>et al.</i> 2006; Nam <i>et al.</i> 2007) Human, Mouse

BMP, bone morphogenetic protein; TGFβ, transforming growth factor β.



**Fig. 5.** Induction of an extra digit in the third interdigital space of a chick leg bud by generation of a wound at stage 28. A and B show expression by *in situ* hybridization of Wnt14 in the tip of the induced extra digit 36 h (A) or 48 h (B) after wounding. C shows the induced digit five days later, as revealed by alcian green staining.

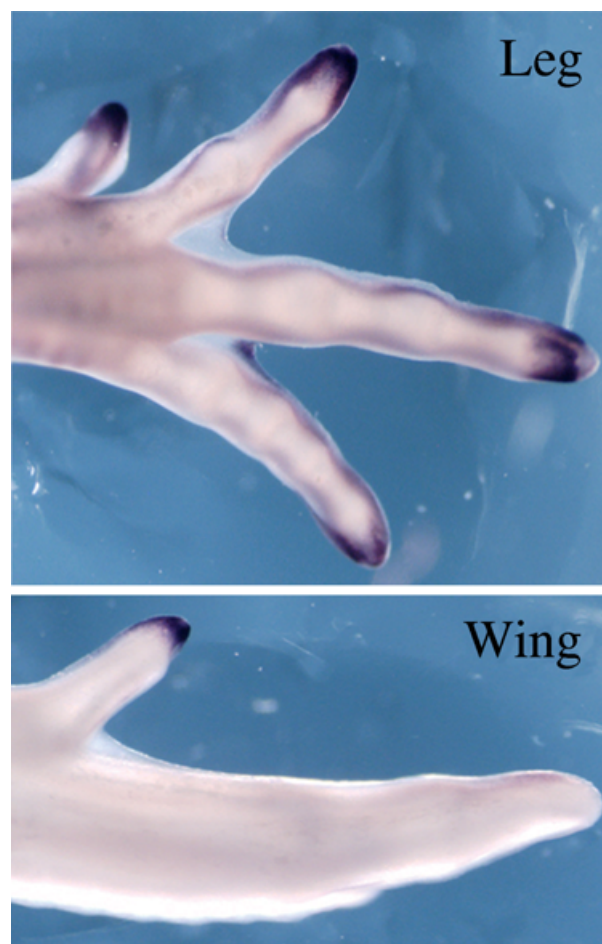
hypothesis, we have carried out a microarray analysis comparing the expression profile of distal versus proximal phalanges of mouse embryos at day E15 (JCC and JJSE unpubl. data). One of the genes that was clearly up-regulated in distal phalanges was BAMBI, a pseudo receptor that acts as an inhibitor of the BMP signaling pathway. This result was a positive validation for our experiment, since the expression of BAMBI in the tip of digits in mouse embryos had been already described (Grotewold *et al.* 2001). To confirm the generality of BAMBI expression in digit tips in other species, we checked whether BAMBI was also present in chicken embryo digit tips. Our results suggest that this is indeed a conserved expression pattern.

### BAMBI expression in chicken digit tips

As mentioned above, BAMBI is a negative feedback regulator of BMP signaling (Onichtchouk *et al.* 1999). It is a transmembrane protein that is related to the TGF $\beta$  family type I receptors, but lacks an intracellular kinase domain. It can however, bind to normal receptors, blocking their function, and thus acts as a naturally occurring dominant negative receptor. Its inhibition of the BMP signaling pathway has been shown in different systems (Onichtchouk *et al.* 1999; Tsang *et al.* 2000). Moreover, BMP and Wnt signaling regulate BAMBI itself (Sekiya *et al.* 2004a, b). Recently, up regulation of BAMBI has been reported to occur during caudal fin regeneration in zebrafish (Schebesta *et al.* 2006)

The expression of BAMBI in mouse embryos has been described, and it includes expression in digit tips at late stages of limb development (Grotewold *et al.* 2001). In chicken embryos it has been used as a marker of interdigital tissue, and it has been shown that in this context it is regulated by BMP signaling too. Application of BMP5 was able to upregulate its expression interdigitally (Zuzarte-Luis *et al.* 2004). We have confirmed the expression of BAMBI in the interdigital spaces of both wings and legs of chicken embryos at different stages of digit development. Also, the regulation by BMP signaling has been confirmed, since application of noggin-soaked beads lead to a down regulation of BAMBI expression (JCC and JJSE unpubl. obs.).

However, the most interesting point for our argument is the expression in digit tips at later stages of digit morphogenesis (Fig. 6). There, BAMBI is strongly expressed in the last phalange in a very specific way,



**Fig. 6.** Expression of chicken BAMBI in tips of digits at stage 36 as revealed by whole mount *in situ* hybridization. Note that in the wing, expression is only present at tip of digit 2.



resembling the expression already seen in mouse. The expression was evident in tips of all toes in the leg. Surprisingly, in the wing it was only expressed in the tip of digit 2, highlighting again the particular nature of digits 3 and 4. This could be related to the absence of claws in these digits and supports the notion of them being truncated digits that lack a proper tip and thus its molecular markers.

### Summary and concluding remarks

Digit morphogenesis is a good model to analyze important general problems in developmental biology. The formation of repeated homologous structures separated by spaces poses several questions. First of all, how the number of digital rays that will form is determined. Then, it is necessary to define digital chondrogenic versus interdigital areas and set up differentiation pathways that will lead to specific cellular fates. Although we know some of the signals involved (TGF $\beta$ s and Sox9 for chondrogenesis and BMPs for apoptosis) the factors that determine the exact location of the primitive condensations and the mechanisms used to inhibit the chondrogenic potential of interdigital tissue are unknown.

A major issue that deserves attention is what determines digit identity and how positional information of cells is translated into anatomy. This may not only reside on chondrogenic cells autonomously, but it could also be transmitted to other tissues (interdigital mesenchyme and AER), establishing local interactions and novel loops that will execute the particular programs to make given digits. The hypothesis that this is mediated by differential interdigital BMP signaling levels has however, been questioned recently. Mouse models with reduced BMP dosage have no obvious transformations of digit identity (Bandyopadhyay *et al.* 2006). Rather, this study postulates that the major role for BMPs in digit morphogenesis is the control of interdigital apoptosis and a later involvement in osteogenesis. Alternatively, it has been suggested that it is the length of time Fgf8 is expressed in the AER that controls digit elongation and thus the number of phalanges. We don't know which factor(s) maintains this activity, but ectopic Shh application to interdigits can elicit this effect, suggesting that endogenous hedgehog signaling may be involved. Deciphering how these interactions between tissues operates to coordinate growth and periodic segmentation to form joints and understanding the signaling pathways involved is a major challenge for the future.

The existence of a particular program to make digit tips is an attractive hypothesis. Discovering the genes involved and the cellular mechanisms implicated

would increase our knowledge of the peculiar characteristics of this structure, and even have practical applications, for example, in any attempt to augment the regenerative ability of digits.

Finally, the implications of these problems go beyond developmental biology. The study of the molecular and cellular mechanisms of digit morphogenesis could help in understanding human congenital malformations. Also, it has a clear relevance for evolutionary analysis, since limbs are one of the most divergent and adaptive structures. For instance, heterochrony of the mechanisms involved in AER maintenance could explain both absence of limbs and production of hyperphalangy, if the timing of an active AER is either reduced or prolonged, respectively. This has indeed been proposed to be the case in cetaceans. In the dolphin flipper, there is evidence that prolonged outgrowth on digits II and III, with maintenance of a morphologically tall (and supposedly active) AER selectively leads to hyperphalangy (Richardson & Oelschläger 2002) and oppositely, defects in the maintenance of AER at earlier stages may have led to the loss of hind limbs (Thewissen *et al.* 2006).

### Acknowledgements

This work has been supported by grant BMC-2003-06100 and a Ramón y Cajal grant to JJSE and a FPU fellowship to JCC from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia. We thank M. Torres for support, laboratory space and helpful discussions.

### References

- Acampora, D., Merlo, G. R., Paleari, L. *et al.* 1999. Craniofacial, vestibular and bone defects in mice lacking the Distal-less-related gene *Dlx5*. *Development* **126**, 3795–3809.
- Ahn, K., Mishina, Y., Hanks, M. C., Behringer, R. R. & Crenshaw, E. B. 3rd. 2001. BMPR-1A signaling is required for the formation of the apical ectodermal ridge and dorsal-ventral patterning of the limb. *Development* **128**, 4449–4461.
- Albrecht, A. N., Schwabe, G. C., Stricker, S., Boddich, A., Wanker, E. E. & Mundlos, S. 2002. The synpolydactyly homolog (*spdh*) mutation in the mouse – a defect in patterning and growth of limb cartilage elements. *Mech. Dev.* **112**, 53–67.
- Altabef, M., Clarke, J. D. & Tickle, C. 1997. Dorso-ventral ectodermal compartments and origin of apical ectodermal ridge in developing chick limb. *Development* **124**, 4547–4556.
- Archer, C. W., Dowthwaite, G. P. & Francis-West, P. 2003. Development of synovial joints. *Birth Defects Res. C Embryo Today* **69**, 144–155.
- Bandyopadhyay, A., Tsuji, K., Cox, K., Harfe, B. D., Rosen, V. & Tabin, C. J. 2006. Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *PLoS Genet.* **2**, e216.
- Baur, S. T., Mai, J. J. & Dymecki, S. M. 2000. Combinatorial signaling through BMP receptor 1B and GDF5: shaping

- of the distal mouse limb and the genetics of distal limb diversity. *Development* **127**, 605–619.
- Bell, S. M., Schreiner, C. M., Wacław, R. R., Campbell, K., Potter, S. S. & Scott, W. J. 2003. Sp8 is crucial for limb outgrowth and neuropore closure. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**, 12 195–12 200.
- Blaydon, D. C., Ishii, Y., O'toole, E. A. *et al.* 2006. The gene encoding R-spondin 4 (RSPO4), a secreted protein implicated in Wnt signaling, is mutated in inherited anonychia. *Nat. Genet.* **38**, 1245–1247.
- Borgens, R. B. 1982. Mice regrow the tips of their foretoes. *Science* **217**, 747–750.
- Brunet, L. J., McMahon, J. A., McMahon, A. P. & Harland, R. M. 1998. Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science* **280**, 1455–1457.
- Buck, A., Kispert, A. & Kohlhase, J. 2001. Embryonic expression of the murine homologue of SALL1, the gene mutated in Townes-Brocks syndrome. *Mech. Dev.* **104**, 143–146.
- Capdevila, J. & Izpisua Belmonte, J. C. 2001. Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**, 87–132.
- Chimal-Monroy, J., Rodriguez-Leon, J., Montero, J. A. *et al.* 2003. Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: sox genes and BMP signaling. *Dev. Biol.* **257**, 292–301.
- Dahn, R. D. & Fallon, J. F. 2000. Interdigital regulation of digit identity and homeotic transformation by modulated BMP signaling. *Science* **289**, 438–441.
- Davis, R. J., Shen, W., Heanue, T. A. & Mardon, G. 1999. Mouse Dach, a homologue of *Drosophila* dachshund, is expressed in the developing retina, brain and limbs. *Dev. Genes Evol.* **209**, 526–536.
- Engelkamp, D. 2002. Cloning of three mouse Unc5 genes and their expression patterns at mid-gestation. *Mech. Dev.* **118**, 191–197.
- Feduccia, A. 2001. Digit homology of birds and dinosaurs: accommodating the cladogram. *Trends Ecol. Evol.* **16**, 285–286.
- Francis, J. C., Radtke, F. & Logan, M. P. 2005. Notch1 signals through Jagged2 to regulate apoptosis in the apical ectodermal ridge of the developing limb bud. *Dev. Dyn.* **234**, 1006–1015.
- Francis-West, P. H., Abdelfattah, A., Chen, P. *et al.* 1999. Mechanisms of GDF-5 action during skeletal development. *Development* **126**, 1305–1315.
- Galis, F., Kundrat, M. & Metz, J. A. 2005. Hox genes, digit identities and the theropod/bird transition. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* **304**, 198–205.
- Ganan, Y., Macias, D., Duterque-Coquillaud, M., Ros, M. A. & Hurlé, J. M. 1996. Role of TGF beta s and BMPs as signals controlling the position of the digits and the areas of interdigital cell death in the developing chick limb autopod. *Development* **122**, 2349–2357.
- Gao, B., Guo, J., She, C. *et al.* 2001. Mutations in IHH, encoding Indian hedgehog, cause brachydactyly type A-1. *Nat. Genet.* **28**, 386–388.
- Godwin, A. R. & Capecchi, M. R. 1998. Hoxc13 mutant mice lack external hair. *Genes Dev.* **12**, 11–20.
- Grotewold, L., Plum, M., Dildrop, R., Peters, T. & Ruther, U. 2001. Bambi is coexpressed with Bmp-4 during mouse embryogenesis. *Mech. Dev.* **100**, 327–330.
- Hall, B. K. & Miyake, T. 2000. All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays* **22**, 138–147.
- Hammond, K. L., Hanson, I. M., Brown, A. G., Lettice, L. A. & Hill, R. E. 1998. Mammalian and *Drosophila* dachshund genes are related to the Ski proto-oncogene and are expressed in eye and limb. *Mech. Dev.* **74**, 121–131.
- Han, M., Yang, X., Farrington, J. E. & Muneoka, K. 2003. Digit regeneration is regulated by Msx1 and BMP4 in fetal mice. *Development* **130**, 5123–5132.
- Harfe, B. D., Scherz, P. J., Nissim, S., Tian, H., McMahon, A. P. & Tabin, C. J. 2004. Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. *Cell* **118**, 517–528.
- Hartmann, C. & Tabin, C. J. 2001. Wnt-14 plays a pivotal role in inducing synovial joint formation in the developing appendicular skeleton. *Cell* **104**, 341–351.
- Karsenty, G. & Wagner, E. F. 2002. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev. Cell* **2**, 389–406.
- Kawakami, Y., Capdevila, J., Buscher, D., Itoh, T., Rodriguez Esteban, C. & Izpisua Belmonte, J. C. 2001. WNT signals control FGF-dependent limb initiation and AER induction in the chick embryo. *Cell* **104**, 891–900.
- Kawakami, Y., Esteban, C. R., Matsui, T., Rodriguez-Leon, J., Kato, S. & Belmonte, J. C. 2004. Sp8 and Sp9, two closely related buttonhead-like transcription factors, regulate Fgf8 expression and limb outgrowth in vertebrate embryos. *Development* **131**, 4763–4774.
- Kengaku, M., Capdevila, J., Rodriguez-Esteban, C. *et al.* 1998. Distinct WNT pathways regulating AER formation and dorsoventral polarity in the chick limb bud. *Science* **280**, 1274–1277.
- Kimmel, R. A., Turnbull, D. H., Blanquet, V., Wurst, W., Loomis, C. A. & Joyner, A. L. 2000. Two lineage boundaries coordinate vertebrate apical ectodermal ridge formation. *Genes Dev.* **14**, 1377–1389.
- Kraus, P., Fraidenraich, D. & Loomis, C. A. 2001. Some distal limb structures develop in mice lacking Sonic hedgehog signaling. *Mech. Dev.* **100**, 45–58.
- Kronenberg, H. M. 2003. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* **423**, 332–336.
- Kruger, M., Mennerich, D., Fees, S., Schafer, R., Mundlos, S. & Braun, T. 2001. Sonic hedgehog is a survival factor for hypaxial muscles during mouse development. *Development* **128**, 743–752.
- Lee, K. K., Li, F. C., Yung, W. T., Kung, J. L., Ng, J. L. & Cheah, K. S. 1994. Influence of digits, ectoderm, and retinoic acid on chondrogenesis by mouse interdigital mesoderm in culture. *Dev. Dyn.* **201**, 297–309.
- Lewandoski, M., Sun, X. & Martin, G. R. 2000. Fgf8 signalling from the AER is essential for normal limb development. *Nat. Genet.* **26**, 460–463.
- Litingtung, Y., Dahn, R. D., Li, Y., Fallon, J. F. & Chiang, C. 2002. Shh and Gli3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. *Nature* **418**, 979–983.
- Loomis, C. A., Kimmel, R. A., Tong, C. X., Michaud, J. & Joyner, A. L. 1998. Analysis of the genetic pathway leading to formation of ectopic apical ectodermal ridges in mouse Engrailed-1 mutant limbs. *Development* **125**, 1137–1148.
- Lu, P., Minowada, G. & Martin, G. R. 2006. Increasing Fgf4 expression in the mouse limb bud causes polysyndactyly and rescues the skeletal defects that result from loss of Fgf8 function. *Development* **133**, 33–42.
- Macias, D., Ganan, Y., Sampath, T. K., Piedra, M. E., Ros, M. A. & Hurlé, J. M. 1997. Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. *Development* **124**, 1109–1117.

- Mariani, F. V. & Martin, G. R. 2003. Deciphering skeletal patterning: clues from the limb. *Nature* **423**, 319–325.
- Merino, R., Ganan, Y., Macias, D., Economides, A. N., Sampath, K. T. & Hurler, J. M. 1998. Morphogenesis of digits in the avian limb is controlled by FGFs, TGFbetas, and noggin through BMP signaling. *Dev. Biol.* **200**, 35–45.
- Merino, R., Macias, D., Ganan, Y. *et al.* 1999a. Expression and function of Gdf-5 during digit skeletogenesis in the embryonic chick leg bud. *Dev. Biol.* **206**, 33–45.
- Merino, R., Macias, D., Ganan, Y. *et al.* 1999b. Control of digit formation by activin signalling. *Development* **126**, 2161–2170.
- Muller, T. L., Ngo-Muller, V., Reginelli, A., Taylor, G., Anderson, R. & Muneoka, K. 1999. Regeneration in higher vertebrates: limb buds and digit tips. *Semin. Cell Dev. Biol.* **10**, 405–413.
- Nam, J. S., Turcotte, T. J. & Yoon, J. K. 2007. Dynamic expression of R-spondin family genes in mouse development. *Gene Expr. Patterns* **7**, 306–312.
- Nishinakamura, R., Matsumoto, Y., Nakao, K. *et al.* 2001. Murine homolog of SALL1 is essential for ureteric bud invasion in kidney development. *Development* **128**, 3105–3115.
- Niswander, L. 2003. Pattern formation: old models out on a limb. *Nat. Rev. Genet.* **4**, 133–143.
- Nye, H. L., Cameron, J. A., Chernoff, E. A. & Stocum, D. L. 2003. Regeneration of the urodele limb: a review. *Dev. Dyn.* **226**, 280–294.
- Ohuchi, H., Nakagawa, T., Yamamoto, A. *et al.* 1997. The mesenchymal factor, FGF10, initiates and maintains the outgrowth of the chick limb bud through interaction with FGF8, an apical ectodermal factor. *Development* **124**, 2235–2244.
- Onichtchouk, D., Chen, Y. G., Dosch, R. *et al.* 1999. Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* **401**, 480–485.
- Ott, T., Parrish, M., Bond, K., Schwaeger-Nickolenko, A. & Monaghan, A. P. 2001. A new member of the spalt like zinc finger protein family, Msal-3, is expressed in the CNS and sites of epithelial/mesenchymal interaction. *Mech. Dev.* **101**, 203–207.
- Pizette, S., Abate-Shen, C. & Niswander, L. 2001. BMP controls proximodistal outgrowth, via induction of the apical ectodermal ridge, and dorsoventral patterning in the vertebrate limb. *Development* **128**, 4463–4474.
- Pizette, S. & Niswander, L. 2000. BMPs are required at two steps of limb chondrogenesis: formation of prechondrogenic condensations and their differentiation into chondrocytes. *Dev. Biol.* **219**, 237–249.
- Reginelli, A. D., Wang, Y. Q., Sassoon, D. & Muneoka, K. 1995. Digit tip regeneration correlates with regions of Msx1 (Hox 7) expression in fetal and newborn mice. *Development* **121**, 1065–1076.
- Richardson, M. K. & Oelschläger, H. A. 2002. Time, pattern, and heterochrony: a study of hyperphalangy in the dolphin embryo flipper. *Evol. Dev.* **4**, 435–444.
- Riddle, R. D., Johnson, R. L., Laufer, E. & Tabin, C. 1993. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* **75**, 1401–1416.
- Ros, M. A., Piedra, M. E., Fallon, J. F. & Hurler, J. M. 1997. Morphogenetic potential of the chick leg interdigital mesoderm when diverted from the cell death program. *Dev. Dyn.* **208**, 406–419.
- Rubin, L. & Saunders, J. W. Jr. 1972. Ectodermal-mesodermal interactions in the growth of limb buds in the chick embryo: constancy and temporal limits of the ectodermal induction. *Dev. Biol.* **28**, 94–112.
- Sanz-Ezquerro, J. J. & Tickle, C. 2000. Autoregulation of Shh expression and Shh induction of cell death suggest a mechanism for modulating polarising activity during chick limb development. *Development* **127**, 4811–4823.
- Sanz-Ezquerro, J. J. & Tickle, C. 2003a. Digital development and morphogenesis. *J. Anat.* **202**, 51–58.
- Sanz-Ezquerro, J. J. & Tickle, C. 2003b. Fgf signaling controls the number of phalanges and tip formation in developing digits. *Curr. Biol.* **13**, 1830–1836.
- Saunders, J. W. Jr. 1948. The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. *J. Exp. Zool.* **108**, 363–404.
- Schebesta, M., Lien, C. L., Engel, F. B. & Keating, M. T. 2006. Transcriptional profiling of caudal fin regeneration in zebrafish. *ScientificWorldJournal* **6**, 38–54.
- Sekiya, T., Adachi, S., Kohu, K. *et al.* 2004a. Identification of BMP and activin membrane-bound inhibitor (BAMBI), an inhibitor of transforming growth factor-beta signaling, as a target of the beta-catenin pathway in colorectal tumor cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 6840–6846.
- Sekiya, T., Oda, T., Matsuura, K. & Akiyama, T. 2004b. Transcriptional regulation of the TGF-beta pseudoreceptor BAMBI by TGF-beta signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**, 680–684.
- Shubin, N. H. & Alberch, P. 1986. A morphogenetic approach to the origin and basic organization of the tetrapod limb. In *Evolutionary Biology*, Vol 20 (eds M. K. W. B. Hecht & G. T. Prance), pp. 319–387. Plenum Press, New York.
- Storm, E. E., Huynh, T. V., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Kingsley, D. M. & Lee, S. J. 1994. Limb alterations in brachypodism mice due to mutations in a new member of the TGF beta-superfamily. *Nature* **368**, 639–643.
- Storm, E. E. & Kingsley, D. M. 1996. Joint patterning defects caused by single and double mutations in members of the bone morphogenetic protein (BMP) family. *Development* **122**, 3969–3979.
- Storm, E. E. & Kingsley, D. M. 1999. GDF5 coordinates bone and joint formation during digit development. *Dev. Biol.* **209**, 11–27.
- Suzuki, T., Takeuchi, J., Koshiba-Takeuchi, K. & Ogura, T. 2004. Tbx genes specify posterior digit identity through Shh and BMP signaling. *Dev. Cell* **6**, 43–53.
- Talamillo, A., Bastida, M. F., Fernandez-Teran, M. & Ros, M. A. 2005. The developing limb and the control of the number of digits. *Clin. Genet.* **67**, 143–153.
- Tang, M. K., Leung, A. K., Kwong, W. H. *et al.* 2000. Bmp-4 requires the presence of the digits to initiate programmed cell death in limb interdigital tissues. *Dev. Biol.* **218**, 89–98.
- Thewissen, J. G., Cohn, M. J., Stevens, L. S., Bajpai, S., Heyning, J. & Horton, W. E. Jr. 2006. Developmental basis for hind-limb loss in dolphins and origin of the cetacean bodyplan. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103**, 8414–8418.
- Tickle, C. 2000. Limb development: an international model for vertebrate pattern formation. *Int. J. Dev. Biol.* **44**, 101–108.
- Tickle, C. 2002. The early history of the polarizing region: from classical embryology to molecular biology. *Int. J. Dev. Biol.* **46**, 847–852.
- Tickle, C. 2003. Patterning systems – from one end of the limb to the other. *Dev. Cell* **4**, 449–458.
- Tickle, C., Summerbell, D. & Wolpert, L. 1975. Positional signalling and specification of digits in chick limb morphogenesis. *Nature* **254**, 199–202.
- Treichel, D., Schock, F., Jackle, H., Gruss, P. & Mansouri, A. 2003. mBtd is required to maintain signaling during murine limb development. *Genes Dev.* **17**, 2630–2635.

- Tsang, M., Kim, R., De Caestecker, M. P., Kudoh, T., Roberts, A. B. & Dawid, I. B. 2000. Zebrafish *nma* is involved in TGFbeta family signaling. *Genesis* **28**, 47–57.
- Vargas, A. O. & Fallon, J. F. 2005. The digits of the wing of birds are 1, 2, and 3. A review. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* **304**, 206–219.
- Wagner, E. F. & Karsenty, G. 2001. Genetic control of skeletal development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 527–532.
- Wang, B., Fallon, J. F. & Beachy, P. A. 2000. Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell* **100**, 423–434.
- Welten, M. C., Verbeek, F. J., Meijer, A. H. & Richardson, M. K. 2005. Gene expression and digit homology in the chicken embryo wing. *Evol. Dev.* **7**, 18–28.
- Wilkie, A. O., Patey, S. J., Kan, S. H., Van Den Ouweland, A. M. & Hamel, B. C. 2002. FGFs, their receptors, and human limb malformations: clinical and molecular correlations. *Am. J. Med. Genet.* **112**, 266–278.
- Wolpert, L. 1969. Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *J. Theor. Biol.* **25**, 1–47.
- Wolpert, L. 1989. Positional information revisited. *Development* **107** (Suppl.), 3–12.
- Yang, Y., Drossopoulou, G., Chuang, P. T. *et al.* 1997. Relationship between dose, distance and time in Sonic Hedgehog mediated regulation of anteroposterior polarity in the chick limb. *Development* **124**, 4393–4404.
- Yokouchi, Y., Sakiyama, J., Kameda, T. *et al.* 1996. BMP-2/-4 mediate programmed cell death in chicken limb buds. *Development* **122**, 3725–3734.
- Yoon, B. S., Ovchinnikov, D. A., Yoshii, I., Mishina, Y., Behringer, R. R. & Lyons, K. M. 2005. *Bmpr1a* and *Bmpr1b* have overlapping functions and are essential for chondrogenesis *in vivo*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 5062–5067.
- Zou, H. & Niswander, L. 1996. Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation. *Science* **272**, 738–741.
- Zou, H., Wieser, R., Massague, J. & Niswander, L. 1997. Distinct roles of type I bone morphogenetic protein receptors in the formation and differentiation of cartilage. *Genes Dev.* **11**, 2191–2203.
- Zuniga, A., Haramis, A. P., McMahon, A. P. & Zeller, R. 1999. Signal relay by BMP antagonism controls the SHH/FGF4 feedback loop in vertebrate limb buds. *Nature* **401**, 598–602.
- Zuzarte-Luis, V., Montero, J. A., Rodriguez-Leon, J., Merino, R., Rodriguez-Rey, J. C. & Hurler, J. M. 2004. A new role for BMP5 during limb development acting through the synergic activation of Smad and MAPK pathways. *Dev. Biol.* **272**, 39–52.

# AGRADECIMIENTOS

Cinco años dan para mucho, en especial a la hora de dar las gracias y particularmente en mi caso, en el que tengo mucho que agradecer. Cuando uno escribe los agradecimientos se da cuenta de que este apartado será el más leído de la tesis, lo que supone un extra de presión. Tantas personas han formado parte de esta tesis doctoral que estoy seguro que, injustamente, me voy a dejar nombres en el tintero, de modo que pido perdón por adelantado. Procuraré no ponerme muy sentimental pero sé de sobra que no lo voy a cumplir.

Antes de empezar, me gustaría referirme a unos protagonistas involuntarios de esta tesis doctoral. Estos son todos y cada uno de los animales adultos y en forma embrionaria que han sido utilizados en los experimentos. A ellos, aunque no les sirva de mucho, perdón y gracias. Es lo mínimo.

Gracias, en primer lugar a Antonio Bernad, que me permitió formar parte de esa gran familia que es el DIO, lugar dónde todo comenzó. Sin él esto no habría sido igual. No obstante, si hay alguien responsable de que acabase haciendo la tesis doctoral es Daniel Lucas, mi primer maestro. Muchas Gracias Dani Wan Kenobi por enseñarme los caminos de la Fuerza. En ti encontré un sufrido mentor y un amigo inigualable. Además, durante mi estancia en el 412 nunca podré olvidar a Chus, Pilarín, Bárbara, Gel e Isa (Equipín), Rocio, Dani y Javi. Probablemente ella no se acuerde, pero fue Gel quien en una tarde de otoño me abrió los ojos y me empujó a este incomparable mundo de la biología del desarrollo y a terminar haciendo la tesis con “ese chico de la coleta que era tan majo”.

De él voy a hablar. Al igual que Luke Skywalker acudió a Yoda en busca de conocimiento, yo hice lo mismo con Juanjo. A ti le debo esta tesis. Has sido un jefe cercano, dialogante, comprensivo y tremendamente didáctico. Aunque suene a tópico, has sido el mejor director de tesis que nadie haya podido tener y ser tu primer becario, es para mí un honor y un privilegio. Muchas, pero que muchas gracias. También gracias a Miguel, que me acogió como a cualquiera de sus doctorandos y me ha permitido aprender y hacer ciencia, que es lo que más me gusta.

Habiendo pasado por dos centros diferentes, el número de personas a las que dar las gracias se duplica, más si uno de estos departamentos ha sido el DIO.

Agradezco la alegría que contagian todas y cada una de las chicas de Ana Clara (incluido Domingo). Habéis sido unas maravillosas compañeras de labo en esta tesis doctoral.

También a los “pomperos”. Con vuestra llegada dejamos de ser los raros que estudiábamos embriones en un departamento de inmunología. Ahora estando en el CNIC, creo que lo poco que sé de corazón se lo debo a vuestros seminarios.

Un agradecimiento especial a Amit, que pronto va a ser papá y al que le espera una escritura de tesis acompañado de noches en vela y pañales, sonajeros y pañales y biberones y más pañales...

No puedo olvidarme de Jesús Sánchez (ni yo ni nadie), genio y figura, una de las mejores personas que conozco y probablemente la más divertida. Despistado, ocurrente...si no hubiese pasado una semana en New York oyéndote roncar pensaría que eres un personaje de uno de esos cómics que dibujas.

Las chicas de Isabel Mérida también son capaces de alegrarte el día (en el buen sentido), Mari Angeles, Toñi, Teresa, Marías... Muchas Gracias,

Estherín, tú has sido una de las personas más importantes en esta tesis doctoral. Bubilla donde las haya, pasaste de ser “la borde” del DIO a ser una de mis mejores amigas. Contigo descubrí el diccionario Abadeño-Español, Español-Abadeño y que en los tugurios de Lavapiés, en los que solo hay “tragos” no se puede pedir un ponche.

Mireia, Oscar, María, Pepe, Eli, Ernesto, Ardavinas, Laura (también conocida como la chica de la sonrisa eterna)...son tantos y tan buenos recuerdos, que hacen de mi estancia en el CNB, uno de las mejores etapas de mi vida. Cathi, por tu esmero, paciencia y dedicación. Coral, por tu dulzura y tu amor por lo dulce. Antonio porque no se por cuál extraña razón echo de menos hasta sus collejas. Gracias a Ana, Carol, Lorena y Marisol, compañeras de comida en la sala de seminarios, con las que nos reímos tanto y con las que, en **ocasiones**, arreglábamos el mundo. Por supuesto, gracias a Celia por sus “buenos días”.

La aclimatación a nuestra nueva vida en el CNIC, no habría sido posible sin Beatriz, Teresa y Sandra, la nobleza del departamento. A Beatriz la emperatriz, muchas gracias por tu atención, entusiasmo, eficiencia y por tu encomiable ayuda en la realización de esta tesis. A Teresa la princesa, muchas gracias por la personalidad y energía que regalas al departamento. A Lady Sandra, que bajo esa apariencia de seriedad, encierra un ácido humor británico con la sonrisa de una niña. Gracias a las tres. También a las chicas de Manzanares, hasta el momento, nuestras únicas pero inmejorables compañeras. Gracias a Eva por tu dulzura, tu bondad y a tu simpatía. Gracias Susana, en las largas mañanas, cuando tu presencia en el cuarto de los pollos ha evitado que me durmiera encima de la lupa, regalándome tu compañía y tu imponderable conversación. Muchas gracias a Bárbara, científica y extracientíficamente, porque eres capaz, tanto de enseñarme a hacer la T de Student, como de compartir un menú Asiático en el Tiki grill, aderezado con tu encanto. Gracias a Teresa, por ser optimismo en estado puro y por contagiarnos de tu exultante personalidad. Gracias a Bea, que ahora no está y que cuando está, parece que no está, pero que cuando la vas conociendo, sabes que está. Y mucho. Gracias también a Miguelillo que me ha dado mucha, mucha envidia (y ni siquiera sana), pero que aprecio muchísimo y me ayudó mazo en los comienzos de la escritura. Gracias a él, la palabra enfangamiento tiene un sentido especial.

Muchas Gracias a Giovannita. Conmigo has compartido clonajes, PCRs, tu sabiduría, tu experiencia y hasta tu ordenador. Me has tratado con más cariño que a tus células ES y eso es de agradecer. Roissin, porque contigo la histología no tiene secretos, gracias por tu ayuda con el inglés y por tu forma de ser, tan generosa y amable. Gracias a Valeria, por todo lo que pude aprender de ti mientras compartimos pasillo en los orígenes. Gracias a Laura P, Laura C y Adrian que han traído experiencia y saber hacer y que siempre están dispuestos a echar una mano en todo lo que les pidas. Gracias a Nadia cuya capacidad científica sólo es comparable a su increíble calidad humana. Gracias a Cris por tus consejos, por tu apoyo y por compartir tu visión de la ciencia que me ayuda a no hacerme ideas equivocadas. Por ser una post tan pre. Gracias a Carlos, porque su entropía fue mi orden, porque conocerle a él fue conocer a mil personas, por todas y cada una de sus conversaciones tan educativas e ilustrativas, porque se le echa mogollón de menos. Muchas Gracias.

Gracias a Estefanía. Durante tu estancia fuiste una ayuda extraordinaria, tanto con nuestros ratoncillos como aguantando mis tonterías. Creo que nunca dejaste de seguirme una broma. Por ser mi amiga y “la voz” aquel día, muchas gracias. Gracias a Silvia por ser tan divertida y traer al laboratorio tu alegría cada mañana, tarea tan difícil o más que cuidar/genotipar nuestros ratoncitos y que realizas con igual eficiencia. También Eduardo, por ilustrarnos cada día con su infinita sabiduría y hacernos tan entretenidas las comidas. Por compartir sus conocimientos y amor por los animales. Por supuesto, gracias a Claudio, que con tu nombre de emperador, viniste, viste y venciste. Cuando esta tesis se empezaba a hacer cuesta arriba, apareciste, tiraste del carro y fuiste el respaldo que necesitaba. Has sido imprescindible y una parte inmensa de este trabajo te corresponde. Sin embargo el mayor de los agradecimientos es por ser como eres y sobretodo, por estar a mi lado. Pues eso. También gracias a mi jovencísima aprendiz, Verónica, por transmitirme esa ilusión con la que se hace una tesis doctoral y que en los momentos finales queda, a veces, lejana. Joven padawan, siempre a tu disposición, te deseo la mejor de las suertes. Gracias a Javi y Yoanna, por este verano y por ser capaces de mantener la atención en los rollos que os contaba.

Debido a que los cuatro hemos hecho la tesis a la vez, Cati Ana, Alber y Clara sois tres de las personas que más de cerca me habéis acompañado en estos años. Juntos hemos peleado diariamente con electrodos, clonajes e in situs, y eso, a la larga, une. Los tres habéis trabajado a mi lado, codo con codo, me habéis apoyado “a muerte” y lo más importante es que lo habéis hecho con conocimiento de causa. Habéis sido los mejores amigos y compañeros de labo que nadie podrá tener nunca y vuestra amistad y cariño ha sido una de las partes más importante de este doctorado. Por todos esos momentos inolvidables a vuestro lado, gracias.

Gracias a Rocío y Fermín, por ser tan atentos, detallistas y tan maravillosas personas. Por su cariño que nos ha permitido conectar tan bien en tan poco.

Gracias a Sergio y a Carlos, mis otros hermanos. Porque los amigos es la familia que se elige.

Gracias a mis tíos y primos por su aliento y alegría. Por hacer de mi familia una familia diferente, llena de vida. Gracias a Teresa, por ser la mejor suegri. Gracias a mi abuelo Elías por su cariño y por enseñarme valores tan importantes como la humildad, el trabajo y el esfuerzo. Te echo de menos. A mi abuela Maruja por ser la típica abuela de los cuentos, la que tienen sólo los niños buenos. Gracias a mi abuelo Pepe, una de las personas que más admiro y que sabe tanto y de tantas cosas, que nunca podré dejar de escuchar. A mi abuela Luci, mi ángel. Me enseñó a que nunca, bajo ningún concepto se pueden perder las ganas de vivir, a no perder la sonrisa. Me enseñó a luchar con todas mis fuerzas, siempre, hasta el final.

Gracias a mis hermanos Lucía y Ramiro. Mi orgullo. Porque crecer a vuestro lado me ha hecho como soy. Porque un hermano es un hermano y sobran las palabras.

Gracias a mis padres, por su apoyo incondicional, por dármelo todo. Por ser un espejo en el que mirarme.

Gracias a Cristina, mi vida.

MUCHAS GRACIAS A TODOS!!!!